



REDUÇÃO DO TEOR DE CONTAMINANTES QUÍMICOS EM BIVALVES PROVENIENTES DO ESTUÁRIO DO TEJO

Vera de Almeida Cardoso Cunha

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutor António Manuel Barros Marques
Co-orientadora: Doutora Maria Luísa Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Isabel Nunes Januário, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor António Manuel Barros Marques, Investigador Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

Lisboa, 2012

Agradecimentos

Foram diversas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, às quais desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

Ao Doutor António Marques do IPMA pela sua orientação, espírito crítico, bem como a permanente disponibilidade ao longo destes meses de trabalho.

À Professora Doutora Luísa Louro pelos seus conselhos e ensinamentos ao longo de todo o mestrado e no desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a Ana Luísa Maulvault por toda ajuda e boa disposição no laboratório do IPMA e a constante companhia durante todo o trabalho prático.

À minha colega e amiga Nádía Chaveiro por toda amizade e companheirismo.

Aos meus amigos Inês Fonseca e Hugo Teixeira de Sousa, por toda a compreensão e por terem estado sempre dispostos a ouvir-me e a partilhar esta experiência comigo.

Ao meu namorado Bruno Mendonça pelo apoio incondicional, paciência, amizade e dedicação.

À minha Mãe a quem devo tudo o que sou, por acreditar sempre em mim e por estar sempre presente no que preciso.

A todos o meu mais sincero obrigado.

Resumo:

A amêijoia-japonesa (*Ruditapes philippinarum*), mexilhão (*Mytilus* sp.) e lambujinha (*Scrobicularia plana*) são espécies com grande abundância no estuário do Tejo. No entanto, por vezes, apresentam elevados teores de contaminantes químicos.

Este trabalho teve como objectivo determinar a influência da depuração da amêijoia-japonesa, mexilhão e lambujinha nos teores de metais contaminantes (Cd, Pb e Hg) e macro e micro elementos (S, Ca, K, Cl, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb e Sr).

Os resultados revelaram que a depuração foi eficaz na redução dos teores Pb na lambujinha e na amêijoia-japonesa. No mexilhão ao longo da depuração não se registaram diminuições deste contaminante. Nos teores de Cd e Hg a depuração não promoveu decréscimos nas três espécies.

A condição dos bivalves alterou-se ao longo da depuração, registando-se decréscimos drásticos nos teores de glicogénio nos músculos adutores do mexilhão e, sobretudo, da lambujinha para a qual se observaram taxas de mortalidade de 11%. A amêijoia-japonesa revelou melhor adaptação às condições de depuração estudadas.

A depuração mostrou-se, ainda, vantajosa na diminuição do Fe na amêijoia-japonesa e lambujinha, uma vez que estes valores se encontravam acima do limite superior tolerável (UL). Este tratamento não se revelou vantajoso para o mexilhão, tendo apenas promovido a diminuição do Fe.

Palavra-chave: Depuração, bivalves, metais contaminantes, macro e micro elementos.

ABSTRACT

Manila clam (*Ruditapes philippinarum*), mussel (*Mytilus* sp.) and peppery furrow shell clam (*Scrobicularia plana*) are species with high abundance in the Tagus estuary. However, these species may have high levels of contaminant metals.

This study aimed to determine the effect of depuration of manila clam, mussel and peppery furrow shell clam on the content of contaminant metals (Cd, Pb and Hg) and on macro, micro and trace elements (S, Ca, K, Cl, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb and Sr).

The results revealed that the depuration was effective in reducing the levels of Pb in peppery furrow shell clam and Manila clam. In the mussel no decrease was registered in this contaminant. During the depuration no decreases were registered in Hg and Cd.

Mussel and peppery furrow shell clam condition decreased through the depuration, as indicated the glycogen content in the adductor muscle of these bivalves. In peppery furrow shell clam the mortality rate reached 11 %. Manila clam proved to be the most adaptive to depuration conditions.

The depuration also decreased the excess of Fe in Manila clam and peppery furrow shell clam, whose levels were above the tolerable upper limit (UL). In the mussel this decrease resulted in a disadvantageous loss of this mineral.

Keywords: Depuration, bivalves, contaminant metals, macro and trace elements.

EXTENDED ABSTRACT

In Tagus estuary there is a high abundance of clams and other bivalves, which are economically and gastronomically important in Portugal.

Bivalves like Manila clam (*Ruditapes philippinarum*), mussel (*Mytilus* sp.) and peppery furrow shell clam (*Scrobicularia plana*) occupy different habitats, and differ in their morphology, adaptability and retention of contaminant metals.

As filtering organisms, these species often accumulate high concentrations of contaminant metals such as cadmium (Cd), lead (Pb), and mercury (Hg). So it becomes important to evaluate the effect of a depuration treatment, as it can constitute a solution to this problem.

During 16 days, 120 individuals of each species were placed in tanks and the physical chemical parameters of the water were monitored daily. Thirty specimens were collected randomly each four days, obtaining a total of 4 sampling points per species.

Biometric data was recorded at each sampling point, the edible part and the adductor muscle were collected for further analysis. Specimens were pooled in two samples or replicates (n=15), homogenized and freeze dried. Samples were kept at -80 °C until chemical analyses were performed.

Cadmium, lead and mercury were quantified through atomic absorption spectrometry (AAS), and macro and trace elements by energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF). Results showed significant differences between species. Manila clam revealed the highest concentration of the contaminant metals, whereas peppery furrow shell clam registered the lowest concentration of Cd, but the highest values for lead contamination. In the latter, concentrations of Pb dropped to values below the limit established in the EU.

The Pb, Cd and Hg provisional tolerable weekly intake (PTWI) were set at 0.025 mg/kg bw/week, 0.007 mg/kg and 0.004 mg/kg respectively. In the first day, peppery furrow shell clam registered the highest concentration in Pb, restricting its consumption to 6 individuals. Mussel consumption should be limited to 7 individuals due to its content in this contaminant. Regarding Manila clam's content in this contaminant, only 3 individuals should be consumed to avoid the risk of chronic health implications.

Nevertheless it was the Cd content, which limited the consumption of these two last bivalve species. The concentrations of this contaminant suggest a maximum consumption per week of 3 mussels, 7 manila clams and 21 of pepper furrow shell clams without chronic implications.

Mercury levels were less limitative of consumption, but nonetheless constituted risk in all samples.

During the depuration, the bivalves' condition suffered alterations. Glycogen levels decreased in mussel and peppery furrow shell clam. In the latter the mortality rate reached 11 %. Manila clam individuals showed the best adaptation to the depuration conditions.

Regarding macro and trace elements, fluctuations were not relevant, except in the case of Sr, Br, Cl and Rb that decreased differently in the three species studied.

During depuration, the concentration of Pb and Fe decreased in the three species studied. This decrease was beneficial in peppery furrow shell clam and Manila clam, since their Fe content was above the tolerable upper limit (UL).

Índice

1. Objectivos	1
2. Introdução	2
2.1. Importância dos Moluscos Bivalves.....	3
2.1.1. Mundial	3
2.1.2. Portugal	6
2.2. Técnicas de Captura	9
2.3. Depuração	11
2.4. Estuário do Tejo.....	15
2.4.1. Comunidades piscatórias.....	17
2.4.2. Problemática ambiental	18
2.5. Moluscos bivalves no estuário do Tejo	19
2.5.1. Amêijoia-japonesa.....	21
2.5.2. Lambujinha	24
2.5.3. Mexilhão.....	26
2.6. Benefícios associados ao consumo de bivalves.....	28
2.7. Riscos associados ao consumo de bivalves	32
3. Materiais e Métodos.....	40
3.1. Colheita das Amostras em meio natural	40
3.2. Amostragem durante a depuração	41
3.3. Determinação dos metais pesados.....	42
3.4. Teor de glicogénio	43
3.5. Teor de macro e micro elementos	44
3.6. Tratamento dos dados.....	45
4. Resultados e discussão	46
4.1. Dados biométricos.....	46
4.2. Glicogénio	49
4.3. Influência da depuração no teor de metais contaminantes	51
4.4. Teor de macro e micro elementos	55
5. Conclusão.....	64

6. Referências Bibliográficas	66
7. Anexos	73

Índice de Figuras

Figura 1: Evolução da captura de animais marinhos entre 2003 e 2009 no mundo (FAO, 2011).....	3
Figura 2: Evolução da captura de moluscos entre 2003 e 2009 no mundo (FAO, 2011).	3
Figura 3: Captura de bivalves ao longo dos anos no mundo (FAO, 2011).....	4
Figura 4: Principais espécies capturadas no mundo (FAO, 2011).....	4
Figura 5: Evolução da aquicultura e principais grupos de pescado (FAO, 2011).....	5
Figura 6: Evolução da Produção das Principais espécies de bivalves entre 2003 e 2009 no mundo (FAO,2011).	6
Figura 7: Principais espécies capturadas em Portugal entre 2003 a 2009 (FAO,2011).	7
Figura 8: Quantidade produzida de bivalves em Portugal entre 2003 a 2009 (FAO,2011).....	8
Figura 9: Evolução das importações e exportações de bivalves em Portugal de 1990 a 2009 (FAO, 2012).	8
Figura 10: Ganchorra. Adaptado de (http://www.dn.pt/l) (http://apescadesportiva.blogspot.com/).	9
Figura 11a: Adriça ; 11b Berbigoeira ; 11c Mergulhador no Tejo. Adaptado (http://www.portosdeportugal.pt)	10
Figura 12: Estuário do Tejo. Adaptado de (http://www.arhtejo.pt/).	15
Figura 13: Distribuição espacial das concentrações de cádmio e chumbo (μg) no estuário do Tejo (Adaptado de Vale <i>et al.</i> , 2008).	16
Figura 14: Localização dos “portos” e dos principais ancoradouros de pesca no estuário do Tejo (1998) (Souto, 2001).	17
Figura 15: Esquema da constituição de moluscos bivalves. Adaptado de (http://fossil.uc.pt/).	19
Figura 16: Amêijoia-Japonesa	21
Figura 17: Morfologias da amêijoia-japonesa.	21
Figura 18: Lambujinha.	24
Figura 19: Lambujinha com os sifões estendidos. Adaptado de (http://www.arkive.org).	24
Figura 20: Mexilhão.	26
Figura 21a : Uso das válvulas. Adaptado de (http://www.weichtiere.at/). 21b – Mexilhão fixado a substrato pelo uso do bisso.	26
Figura 22: Praia de Algés.....	41
Figura 23: Sítio das Hortas em Alcochete.	41
Figura 24: Mexilhão com presença de caranguejo ervilha.....	48
Figura 25: Concentração de glicogénio nas três espécies bivalves durante a depuração.....	50
Figura 26: Teores médios de chumbo \pm desvio-padrão (mg/kg) nas três espécies, ao longo do tempo de depuração.	51

Figura 27: Teores médios de cádmio \pm desvio-padrão (mg/kg) nas três espécies, ao longo do tempo de depuração.	52
Figura 28: Teores médios de mercúrio \pm desvio-padrão (mg/kg) nas três espécies, ao longo do tempo de depuração.	53
Figura 29: Teor de Fe nas três espécies.	59
Figura 30: Teor de Br nas três espécies.	59
Figura 31: Teor de Sr nas três espécies.	60
Figura 32: Teor de Cl nas três espécies.	61
Figura 33: Teor de Rb nas três espécies.	62

Índice de Tabelas

Tabela 1: Sistema de classificação e respectivo significado.....	11
Tabela 2: Condições de estabulação de algumas espécies durante a depuração (SFIA).	13
Tabela 3: Valores médios da composição química aproximada (g/100g de parte edível) do valor energético (kcal e kj/100g de parte edível) das espécies de bivalves de maior interesse comercial.	28
Tabela 4: Valores médios dos principais minerais (por 100g de parte edível) nas espécies de bivalves de maior interesse comercial (adaptado de www.nutrition.data.com).	29
Tabela 5: Valores médios (mg/100g de parte edível) dos principais ácidos gordos nas amêijoas e berbigão produzidos em Portugal (Bandarra <i>et al.</i> , 2004).	31
Tabela 6: Teores máximos admissíveis de cádmio, chumbo e mercúrio nos moluscos bivalves nos termos dos Regulamentos (CE) N.º 1881/2006 de 19/12/2006 e 629/2008 de 2/7/2009.	34
Tabela 7: Valores médios iniciais e desvio-padrão para a amêijoia japonesa (n=15), mexilhão (n=15) e lambujinha (n=15).	46
Tabela 8: Correlações entre características biométricas.	47
Tabela 9: Quantidades máximas de bivalves que podem ser consumidas semanalmente por metal pesado, considerando um adulto de 60 Kg.	54
Tabela 10: Teores médios de minerais em mg/100g de mexilhão em peso húmido e respectivos desvios padrão.	56
Tabela 11: Teores médios de minerais em mg/100g de lambujinha em peso húmido e respectivos desvios padrão.	57
Tabela 12: Teores médios de minerais em mg/100g de amêijoia e respectivos desvios padrão.	58

Abreviaturas

EPA- Agência de Protecção do Ambiente dos Estados Unidos da América

FDA- Administração para os Alimentos e “Drogas” dos Estados Unidos da América

FAO- Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas

I-Hg- Mercúrio Inorgânico

GABA- Ácido gama-aminobutírico

MeHg- Metilmercúrio

n- Número de amostras

PAH- Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclico

PCB- Bifenilos Policlorados

PCT- Policlorotrifenilos

POP- Poluentes Orgânicos Persistentes

PTWI- Ingestão semanal tolerável provisória

RDA - Recommended Daily Allowances

UL- Tolerable Upper Intake Level

WHO- Organização Mundial de Saúde

1. Objectivos

A amêijoa-japonesa (*Ruditapes philippinarum*), mexilhão (*Mytilus* sp.) e lambujinha (*Scrobicularia plana*) são espécies importantes na gastronomia portuguesa e com grande abundância no estuário do Tejo. Estas ocupam habitats distintos (ex: substratos e profundidades) ao longo do estuário do Tejo e diferem na sua morfologia, fisiologia, capacidade de adaptação e capacidade de retenção de macro e micro elementos. Por serem espécies que podem acumular metais tóxicos, tais como o cádmio, chumbo e mercúrio torna-se relevante avaliar o efeito da depuração na capacidade de retenção de contaminantes, até valores que permitam diminuir a sua acção toxicológica sobre o Homem e viabilizem o seu consumo e exploração.

Assim este trabalho teve como principais objectivos:

- Estudar os teores de cádmio, chumbo e mercúrio nas três espécies de bivalves provenientes do estuário do Tejo;
- Testar a eficácia do processo de depuração na retenção de elementos contaminantes (Hg, Cd e Pb) nas três espécies;
- Avaliar o nível de outros macro e micro elementos (S, Ca, K, Cl, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb e Sr) existentes nos bivalves durante o processo de depuração;
- Avaliar a condição dos diferentes bivalves durante a depuração.

2. Introdução

Após a última glaciação o Homem trocou as grutas pelo litoral, margens dos rios e estuários (Lubell *et al.*, 1994). Os agregados populacionais sedentarizaram-se e, no caso dos estuários, os moluscos bivalves passaram a constituir uma importante fonte de subsistência, como atestam os concheiros, i.e. achados arqueológicos que provam a relevância dos bivalves como alimento, ornamento e material de confecção de utensílios (Nunes, 2008). Em Portugal existem vários concheiros principalmente na zona interdital, como é caso do Estuário do Tejo (Nunes, 2008).

Os bivalves constituem actualmente uma importante fonte de rendimento, sustento e nutrientes para centenas de milhões de pessoas em todo o Mundo (FAO, 2010). Uma grande parte dos bivalves consumidos são provenientes de zonas costeiras, lagunares e estuarinas. Estes locais têm sido sujeitos a intensas pressões antropogénicas, pois são geralmente locais com elevadas densidades populacionais e industriais, que têm levado a elevados impactos sobre o ambiente e á alteração das relações com os seres vivos que os rodeiam. A contaminação dos bivalves por microorganismos e metais pesados nas águas do Estuário do Tejo é um exemplo perfeito deste facto.

2.1. Importância dos Moluscos Bivalves

2.1.1. Mundial

Os moluscos representam uma importante fonte de rendimento e nutrientes para o Homem (FAO, 2010). A nível mundial são produzidos tanto na pesca como na aquicultura.

Os moluscos representavam em 2009 cerca de 8% da captura mundial de animais marinhos, tendo decrescido 1.1% entre 2003 e 2009, reflexo do aumento da oferta da aquicultura (Figura 1). A maioria das espécies de moluscos seguiu a tendência geral (Figura 2). Em 2009 a quantidade de bivalves capturados foi 3.3% menor que em 2003 (FAO, 2010). As principais espécies de moluscos bivalves (vieiras, ostras, amêijoas e mexilhões) representam o segundo maior grupo de moluscos, capturados, representando cerca de 30%, sendo apenas ultrapassado pelas capturas de chocos, lulas e polvos (FAO, 2011b).

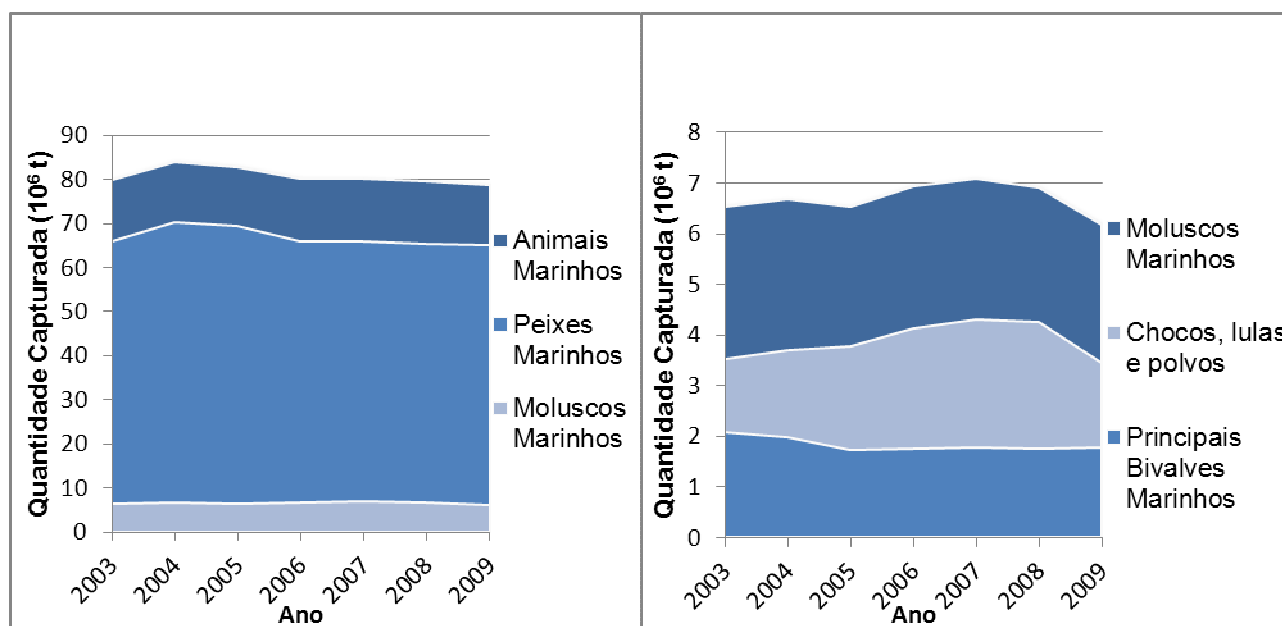


Figura 1: Evolução da captura de animais marinhos entre 2003 e 2009 no mundo (FAO, 2011).

Figura 2: Evolução da captura de moluscos entre 2003 e 2009 no mundo (FAO, 2011).

Os principais grupos de espécies de moluscos bivalves tiveram uma redução da captura entre 2003 e 2009, à excepção das vieiras (Figura 3).

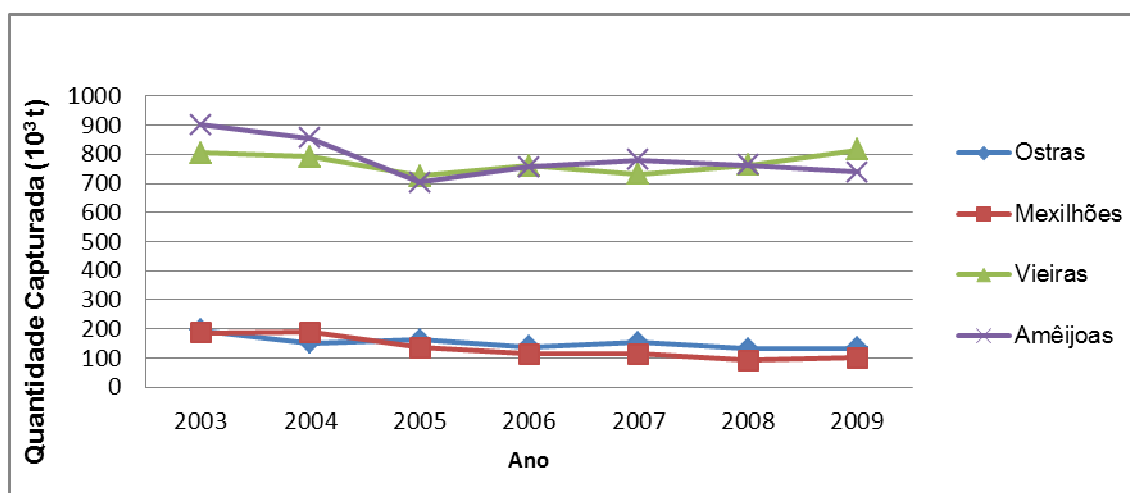


Figura 3: Captura de bivalves ao longo dos anos no mundo (FAO, 2011).

As principais espécies de bivalves capturadas no mundo entre 2003 a 2009 foram a Vieira gigante (*Patinopecten yessoensis*), Vieira do Atlântico (*Placopecten magellanicus*), Amêijoia de Quahog (*Arctica islandica*) e Amêijoia branca Americana (*Spisula solidissima*) (Figura 4).

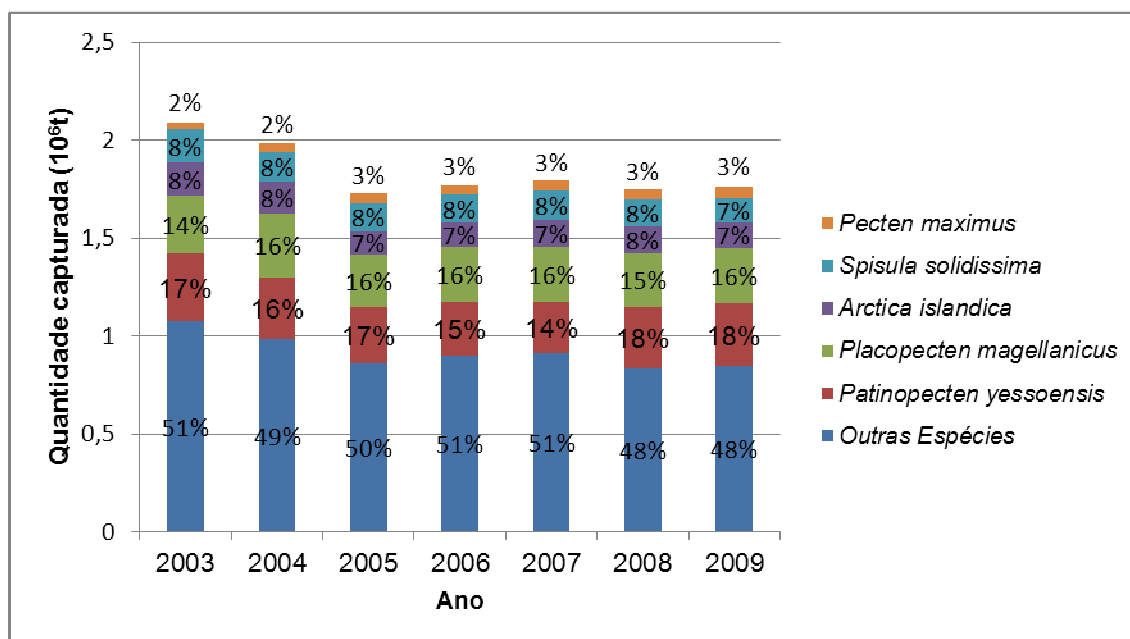


Figura 4: Principais espécies capturadas no mundo (FAO, 2011).

Já na aquicultura os moluscos são o terceiro grupo de espécies mais produzidos (Figura 5), representando em 2009 cerca de 12% da produção aquícola mundial.

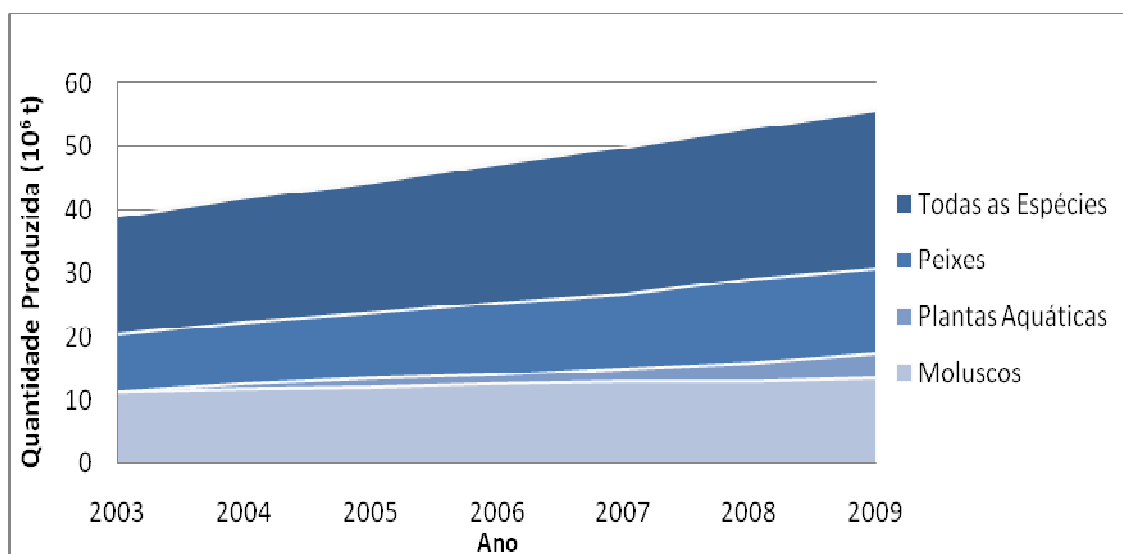


Figura 5: Evolução da aquicultura e principais grupos de pescado (FAO, 2011).

Apesar da produção aquícola ter aumentado 43% de 2003 a 2009, com uma grande contribuição da China (Anexo 1), a produção de moluscos cresceu apenas 19% nesse intervalo de tempo (FAO, 2010).

As principais espécies de bivalves produzidas em aquicultura são: a amêijoia-japonesa (*Ruditapes philippinarum*), navalha chinesa (*Sinonovacula constricta*), a ostra-do-pacífico (*Crassostrea gigas*), berbigão do pacífico ocidental (*Anadara granosa*), mexilhão verde asiático (*Perna viridis*), e vieira gigante do pacífico norte (*Patinopecten yesoensis*) (FAO, 2011b). Combinadas, estas espécies constituíram em 2009, 45% da produção aquícola de bivalves.

A *Ruditapes philippinarum* tem vindo a que aumentar a sua importância ao longo do tempo (Figura 6).

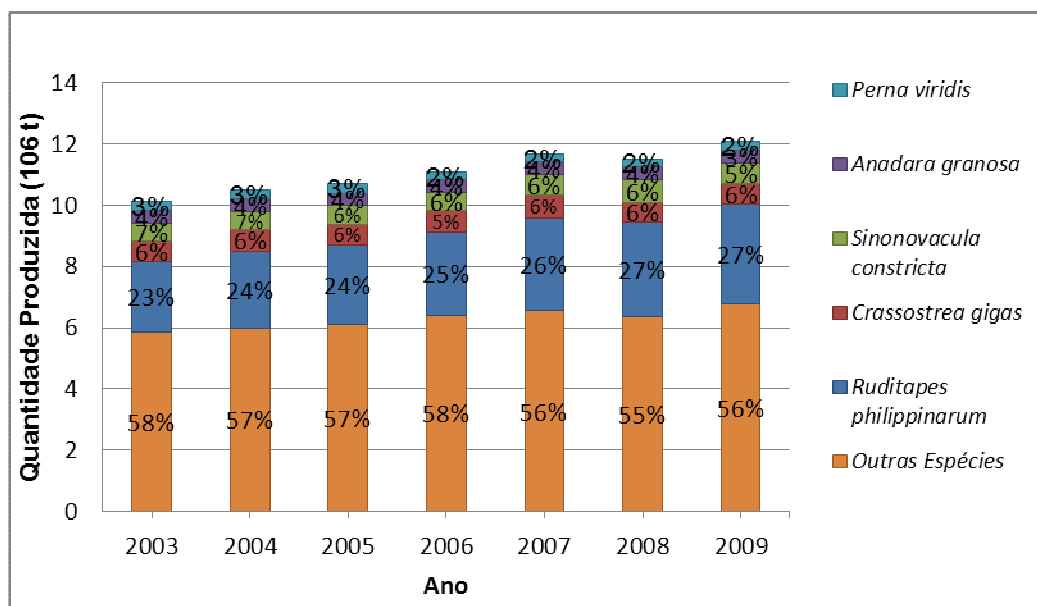


Figura 6: Evolução da Produção das Principais espécies de bivalves entre 2003 e 2009 no mundo (FAO,2011).

Em 2009 os maiores exportadores de bivalves foram, por ordem decrescente, os Estados Unidos, Canadá, Holanda, China e Japão (FAO, 2012). Por seu lado os países que mais importaram bivalves em 2009, foram os Estados Unidos, França, China, Bélgica e Espanha (FAO, 2012).

2.1.2. Portugal

Portugal apresenta uma situação geográfica e condições ambientais que influenciam positivamente a produção de moluscos bivalves, tanto na zona litoral oceânica como nas diferentes zonas lagunares e estuarinas que se distribuem ao longo da orla marítima (Anexo2).

Apesar da captura de animais marinhos em Portugal ter aumentado 5% entre 2003 e 2010, ao contrário da tendência mundial a captura de bivalves diminuiu 26% de 2003 a 2009 no mesmo período. (DGPA, 2003, 2011). Isto deveu-se a redução da captura da amêijoia branca, mexilhão e pé-de-burrinho, apesar da quantidade de berbigão capturado ter aumentado (Figura 7) (FAO, 2011). Esta diminuição ocorreu, sobretudo, na região do Centro do país (DGPA, 2011).

As regiões mais importantes na captura de bivalves são Lisboa, Algarve e Centro. Em Lisboa, a captura de amêijoas aumentou, enquanto no Algarve esta diminuiu.

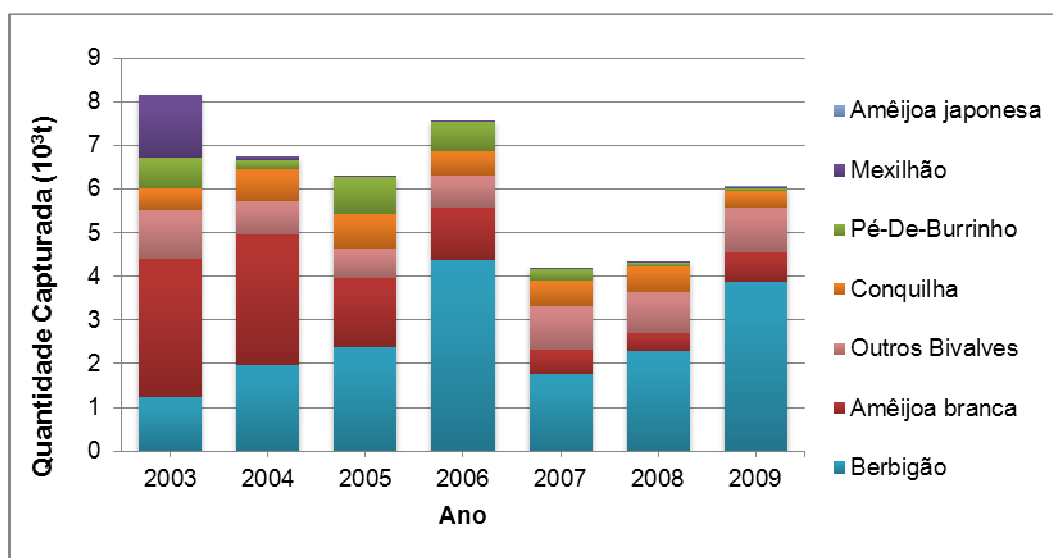


Figura 7: Principais espécies capturadas em Portugal entre 2003 a 2009 (FAO,2011).

Dezasseis espécies são comercializadas provenientes de várias zonas de produção: amêijoia-boia (*Ruditapes decussata*), amêijoia-branca (*Spisula solida*), amêijoia-cão (*Venerupis aureus*), amêijoia-macha (*Venerupis pullastra*), amêijoia-vermelha (*Venerupis rhomboides*), ameijola (*Callista chione*), berbigão (*Cerastoderma edule*), conquilha (*Donax spp.*), lambujinha (*Scrobicularia chione*), longueirão (*Ensis sp.*), mexilhão (*Mytilus sp.*), navalha (*Pharus legumen*), ostra (*Crassostrea spp*), ostra plana (*Ostrea edulis*), pé de burrinho (*Venus striatula*) e pé de burro (*Venus verrucosa*) (Nunes, 2008b).

A produção aquícola nacional global de bivalves decresceu 15 % entre 2003 a 2010, sobretudo na sua exploração em águas doces (FAO, 2012). Em 2010 os bivalves constituíram perto de 49 % da produção aquícola portuguesa (FAO, 2012).

No intervalo mencionado diminuiu a produções de amêijoia (27 %) e de mexilhão (71 %), enquanto o do berbigão aumentou 800 % a sua quantidade (Figura 8). Actualmente surgiram também produções de lambujinha, longueirões e ostras europeias, japonesas, portuguesas e nepalesas (DGPA, 2004, 2006, 2011).

O Algarve é região mais produtiva, com cerca de 90 % da produção aquícola nacional de bivalves produzindo sobretudo amêijoia (Fernandes, 2008).

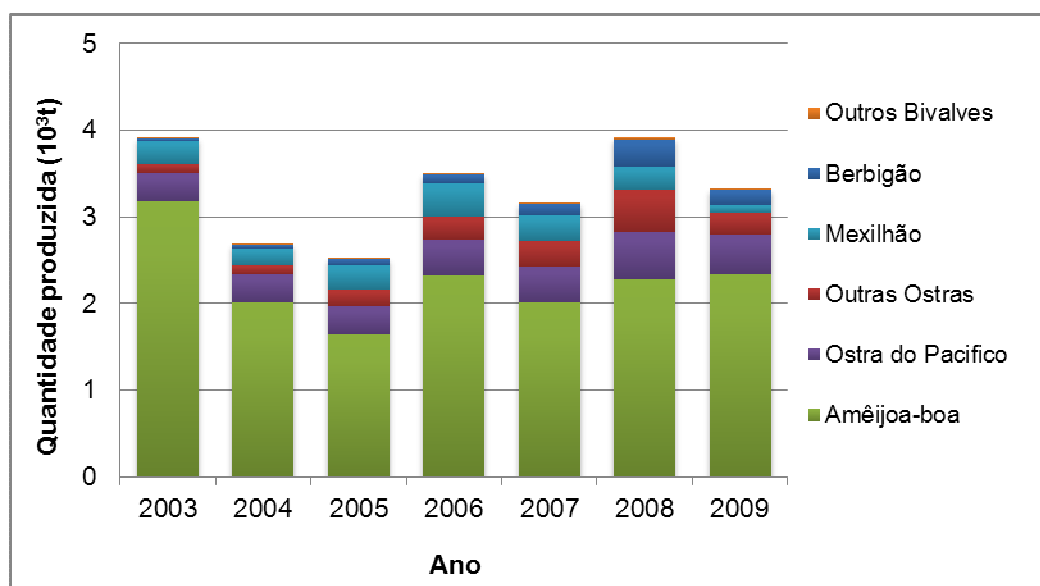


Figura 8: Quantidade produzida de bivalves em Portugal entre 2003 a 2009 (FAO,2011).

Portugal aumenta uma balança comercial desfavorável em relação aos bivalves desde 1994 tendo aumentado a importação nas duas últimas décadas (Figura 9) (FAO, 2012). A partir de 2002 a exportação de bivalves aumentou em valor com alguns altos e baixos, embora este aumento tenha sido menos pronunciado que o das importações.

Em 2009 a nível mundial o nosso país ocupou o 16º lugar na importação de bivalves e o 29º de exportador.

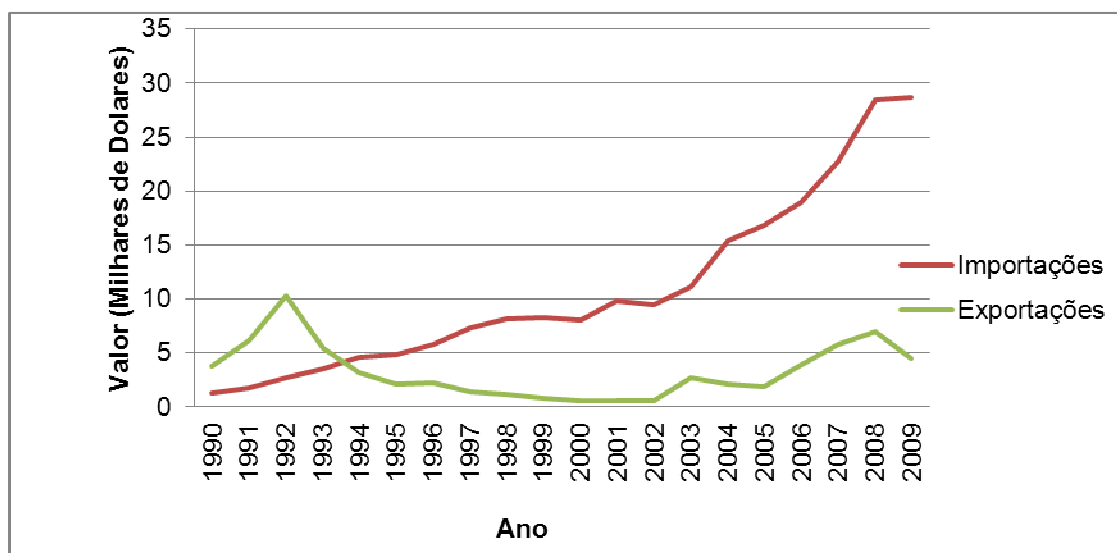


Figura 9: Evolução das importações e exportações de bivalves em Portugal de 1990 a 2009 (FAO, 2012).

2.2. Técnicas de Captura

Os moluscos bivalves provenientes da pesca, com recurso embarcação ou apeada, são capturados em águas oceânicas, interiores marítimas (cf. Regulamentos da Pesca por Arte de Arrasto) e interiores não marítimas (cf. Regulamentos de pesca de incidência local- rios e rias) (Fernandes, 2008).

A captura é efectuada por artes licenciadas para o efeito, pertencentes ao grupo do arrasto, designadamente: ganchorra e ganchorra de mão (apenas em águas oceânicas), berbigoeira e ganchorra manobrada com sarilho (em águas interiores não marítimas) (Figura 10) (Fernandes, 2008).

A ganchorra é uma arte de arrasto, rebocada por uma embarcação perto da costa ou por pescadores na zona de maré. É considerada uma arte de arrasto de pequena ou média dimensão, sem asas, composta por uma armação metálica dotada de um pente de dentes (onde os bivalves ficam retidos) na parte inferior à qual está ligado um saco de rede (DGPA, 2006).

A ganchorra de mão é utilizada na pesca apeada. É considerada de pequena dimensão e é utilizada, manualmente sem auxílio de embarcação, apenas em zonas só alcançáveis na baixa-mar (Fernandes, 2008).

A ganchorra manobrada com sarilho é de pequena dimensão mas manobrada a partir de uma embarcação usando a força manual, incrementada pelo uso de um sarilho, em águas interiores não oceânicas no Rio Tejo (Fernandes, 2008).

Em termos ambientais, as artes de arrasto podem ser prejudiciais, pois provocam a destruição de habitats de espécies bentónicas e afecta a produtividade de diversas espécies.



Figura 10: Ganchorra. Adaptado de (<http://www.dn.pt/l>) (<http://apescadesportiva.blogspot.com/>).

A berbigoeira é uma arte de incidência local, autorizada em alguns rios, rias, e lagoas (Figura 11c). Tal como a ganchorra, pode ser utilizada a bordo de uma embarcação parada ou a pé, por pescador apeado. É arte constituída por uma travessa de ferro com pente de dentes, tendo uma vara para servir de cabo e ligada a um arco onde entralha o saco.

É ainda possível a apanha de moluscos bivalves, gastrópodes e equinodermes, em águas oceânicas, interiores marítimas e não marítimas, no âmbito do Regulamento da Apanha (aprovado pela Portaria n.º 1102 -B/2000, de 22 de Novembro, alterado pelas Portarias n.º 477/2001, de 10 de Maio, e n.º 144/2006, de 20 de Fevereiro, e republicado pela Portaria n.º 1228/2010 de 6 de Dezembro) (Fernandes, 2008). Trata-se de uma actividade individual, a exercer por apanhadores, nas zonas da capitania da área de residência, e zona limítrofes (Fernandes, 2008).

Na apanha de bivalves só podem ser utilizados utensílios como sejam a adriça, ancinho e faca de mariscar. Os apanhadores podem estar apeados ou utilizar embarcação, e efectuar mergulho em apneia. Os volumes de captura para as diferentes espécies estão igualmente bem definidos (Fernandes, 2008).

A adriça é um utensílio constituído por uma haste metálica em ponta, normalmente em forma cónica, servindo para capturar geralmente navalha e lingueirão (Figura 11a). O ancinho é constituído exclusivamente por uma barra com dentes, fixada a um cabo. Por fim a faca é constituída por uma lâmina metálica, com forma variável, de bordos cortantes, fixada ou não a um cabo de madeira.



Figura 11a: Adriça ; 11b Berbigoeira ; 11c Mergulhador no Tejo. Adaptado (<http://www.portosdeportugal.pt>)

2.3. Depuração

Os Regulamentos comunitários N.º 853/2004, de 29 de Abril de 2004 e 854/2004 de 29 de Abril de 2004, estabelecem as regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, e a organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano.

Assim, lotes de bivalves vivos provenientes de zonas de produção moderadamente poluídas (de categoria B) que superem os 230 Unidades Formadoras de Colónia (UFC) de *Escherichia coli*/100 g de parte edível (carne e líquido intervalvar) e que não excedam os limites da categoria de 4600 UFC/100 g (Tabela 1), têm de ser obrigatoriamente depurados. Os valores são baseados num teste do número mais provável de cinco tubos e três diluições de *Escherichia coli* por 100 g (Cachola *et al.*, 2008).

Tabela 1: Sistema de classificação e respectivo significado.

Classe	Teor de <i>Escherichia coli</i> /100g	Observações
A ¹	Inferior a 230	
B ²	De 230 a inferior ou igual a 4600	Em pelo menos 90% das amostras; nenhuma pode exceder 46000
C ³	De 4600 a inferior ou igual a 46000	
Proibida ⁴	Superior a 46000	

1 Os bivalves podem ser apanhados e comercializados para consumo humano directo;

2 Os bivalves podem ser apanhados e destinados a depuração, transposição ou transformação em unidade industrial;

3 Os bivalves podem ser apanhados e destinados a transposição prolongada ou transformação em unidade industrial;

4 Interdita a captura de bivalves. Adaptado de: Regulamento (CE) N.º 854/2004, de 29 1441/2007 de 5 de Dezembro e Regulamento (CE) N.º 1021/2008 de 17 de Outubro.

O processo de depuração baseia-se na capacidade de filtração dos moluscos bivalves. Estes são colocados em tanques desenvolvidos especificamente para o efeito, de forma a permitirem a respiração dos animais (Cachola *et al.*, 2008). Estes tanques contêm água salgada filtrada, esterilizada e com temperatura, salinidade, e oxigenação controlados (Lees *et al.*, 2010). Só estruturas devidamente licenciadas podem efectuar legalmente a depuração de bivalves. A localização dos principais centros de depuração existentes em Portugal encontra-se no Anexo 3.

Os parâmetros de depuração devem permitir que as condições fisiológicas dos bivalves não sejam comprometidas, e que estes possam retomar a actividade de filtração normal e assim excretar os contaminantes. O processo de depuração só se considera iniciado após os bivalves se encontrarem imersos à temperatura, e salinidade que assegurem condições fisiológicas normais de recuperação da actividade de filtração durante pelo menos 42 horas (Cachola & Silva, 2008). A viabilidade deste processo depende do cumprimento de alguns princípios de modo a evitar recontaminações, tais como:

- O acondicionamento dos animais nos tanques deve ser realizado com cuidado para que consigam ter espaço para retomarem actividade de filtração normal, como fariam no ambiente marinho normal (Tabela 2). O mexilhão, por exemplo, consegue sobreviver em águas mais profundas que outras espécies e desta forma pode colocar-se em tanques com grandes quantidades de água. Certos factores variam de espécie para espécie e devem ser tomados em conta antes de se acondicionar os animais;
- A recirculação de água deve permitir que os depósitos sejam removidos em períodos de tempo adequado (Lees *et al.*, 2010; FAO, 2008);
- A salinidade, a temperatura, e o oxigénio dissolvido devem ser controlados e adaptados às diferentes espécies (ver anexos 4 e 5). Nas primeiras horas da depuração os bivalves tendem a aumentar o seu nível de actividade, e nesse caso verifica-se uma diminuição pontual do oxigénio dissolvido. É necessário que todo o sistema seja concebido de forma a permitir um nível com cerca de 50% de saturação de oxigénio na água. Algumas espécies podem consumir mais oxigénio como é o caso dos mexilhões (Lees *et al.*, 2010; FAO, 2008); a

actividade metabólica dos bivalves pode ser alterada durante a depuração principalmente no que concerne o consumo de oxigénio, que é o primeiro indicador de stress: é comum encontrar as válvulas das conchas ligeiramente abertas de modo a assegurar a respiração (El-Shenawy, 2004).

- A turvação causada pela presença de partículas em suspensão na água deve ser controlada pois níveis elevados de partículas em suspensão tendem a diminuir a eficácia da depuração, visto que permitem a retenção e acumulação de microrganismos patogénicos e diminuem a taxa de filtração dos bivalves. A lambujinha *Scrobicularia plana* geralmente retém muito sedimento por ser uma espécie que se encontra enterrada no lodo, pelo que liberta mais detritos do que as restantes espécies.
- Não deve existir mistura de lotes.
- Cada lote deve ser tratado de forma independente;
- Os impactos de queda dos indivíduos nos tanques, carga excessiva, longos períodos fora de água, e temperaturas desajustadas no transporte devem ser evitados (FAO, 2008).

Tabela 2: Condições de estabulação de algumas espécies durante a depuração (SFIA).

Espécie	Profundidade mínima (mm)	Carga máxima recomendada (kg/m ²)	Altura de água acima da camada de bivalves (mm)
Mexilhão	80	50	80
Berbigão	80	50	30
Amêijoia	80	70	30
Ameijola	80	70	30
Ostras (portuguesa do Pacífico) Única camada de animais-530 por m ²			

Nos sistemas de depuração de bivalves utilizados em Portugal, é necessário assegurar a esterilização da água com recurso a três agentes: radiações ultra violeta (UV), ozono ou cloro. As radiações UV inactivam os microrganismos através da destruição das moléculas de ADN dos microrganismos. O ozono e o cloro actuam quimicamente

como agentes oxidantes, promovendo a inativação dos microorganismo. As vantagens e desvantagens destes agentes encontram-se resumidas no Anexo 6 (Cachola & Silva, 2008).

A grande maioria dos estudos realizados sobre a depuração de bivalves incide sobre contaminantes microbiológicos (Chan *et al.*, 1999).

No entanto, existem alguns estudos que demonstram a existência de um mecanismo de depuração nos bivalves para reduzirem a toxicidade dos metais no seu organismo.

2.4. Estuário do Tejo

O Estuário do Tejo localiza-se na costa centro-oeste portuguesa. É o maior estuário de Portugal abrangendo uma área de aproximadamente 320 km², e é composto maioritariamente por zonas intertidais¹ cerca de 40% Figura 11 (Cavaco *et al.*, 2006).

Todo a área o estuário é propícia ao crescimento de bivalves pois apresenta uma mistura de nutrientes provenientes de águas mais frias para a superfície que são transportados ao longo do estuário permitindo uma disseminação dos nutrientes por todas as zonas costeiras (Cavaco *et al.*, 2006). O estuário do Tejo tem um clima ameno com uma temperatura média do ar de 16,3°C e uma precipitação média anual de 700mm embora, muito variável. (Trigo *et al.*, 2004; Gameiro *et al.*, 2004; Cavaco *et al.*, 2006). A temperatura média de água varia entre os 8°C e 26°C (Cabral *et al.*, 1999).



Figura 12: Estuário do Tejo. Adaptado de (<http://www.arhtejo.pt/>).

O estuário está sujeito a uma amplitude média de maré de 2,6 m e o tempo médio de permanência da água doce é de 19 dias (Ferreira *et al.*, 2003). O fluxo médio do rio é de 400 m³s⁻¹, apesar de ser variável, ao longo do ano. Na zona intertidal existem ainda antigos povoamentos de ostras que ocupam uma área de aproximadamente 16 km (Ferreira *et al.*, 2003). Na zona subtidal, os fundos são compostos por uma gama heterogênea de substratos, sendo o sedimento principal nas regiões montante e in-

¹ Zonas sujeitas a marés enriquecidas em nutrientes, bem oxigenadas e que servem de “maternidade” a várias espécies piscícolas (Cavaco *et al.*, 2006).

termédia do estuário constituído por areia-vasosa, enquanto na porção jusante e na área costeira adjacente predominam as areias (Cabral *et al.*, 1999).

Os sedimentos do estuário do Tejo encontram-se contaminados maioritariamente por duas antigas regiões industriais localizadas nas margens norte e sul, bem como por alguns efluentes domésticos provenientes da área metropolitana de Lisboa.

Níveis elevados de chumbo (Pb), cádmio (Cd), zinco (Zn), arsénio (Ar) e outros metais pesados tem sido registados nas águas superficiais, camadas profundas de sedimento, e em matéria particulada. Estes valores verificam-se principalmente nas áreas junto às antigas indústrias metalúrgicas e nalgumas regiões mais afastadas do estuário (Vale *et al.*, 2008).

Estas áreas contaminadas são zonas onde se encontram grandes comunidades de bivalves e onde é usual a sua captura. A distribuição espacial do Cd, e Pb podem ser observadas na Figura 13. A concentração de Cd por exemplo varia entre 0,01 e 0,78 $\mu\text{g/g}$ em amostras recolhidas perto do barreiro, nas regiões mais próximas de áreas industriais os valores podem exceder os 5 $\mu\text{g/g}$ (Vale *et al.*, 2008). Por seu lado, as concentrações de Pb nas zonas mais contaminadas podem exceder os 2000 $\mu\text{g/g}$ (Vale *et al.*, 2008).

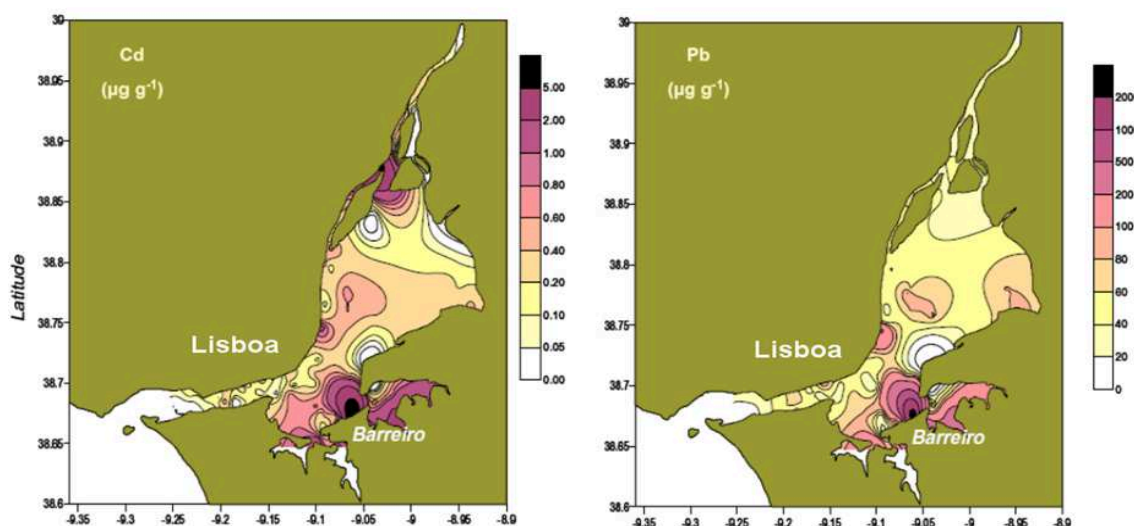


Figura 13: Distribuição espacial das concentrações de cádmio e chumbo ($\mu\text{g/g}$) no estuário do Tejo (Adaptado de Vale *et al.*, 2008).

2.4.1. Comunidades piscatórias

As principais comunidades piscatórias que se encontram no estuário do Tejo são de três tipos, de acordo com a zona em que estão implantadas (Souto, 2001; Figura 14):

- A. Comunidades avieiras, na zona dos mouchões, constituídas por descendentes de pescadores migrantes da Praia da Vieira, que integram também alguns descendentes de Ílhavo e de Murtoseiros, que se cruzaram com os avieiros (Vila Franca de Xira, Alhandra, Póvoa de Santa Iria);
- B. Comunidades do Mar da Palha (margem Sul), basicamente Alcochete, Montijo, Barreiro e Seixal, que são as mais antigas e mais atingidas pelo processo de industrialização;
- C. Comunidades da foz, como sejam Paço de Arcos e Trafaria (Souto, 2001)

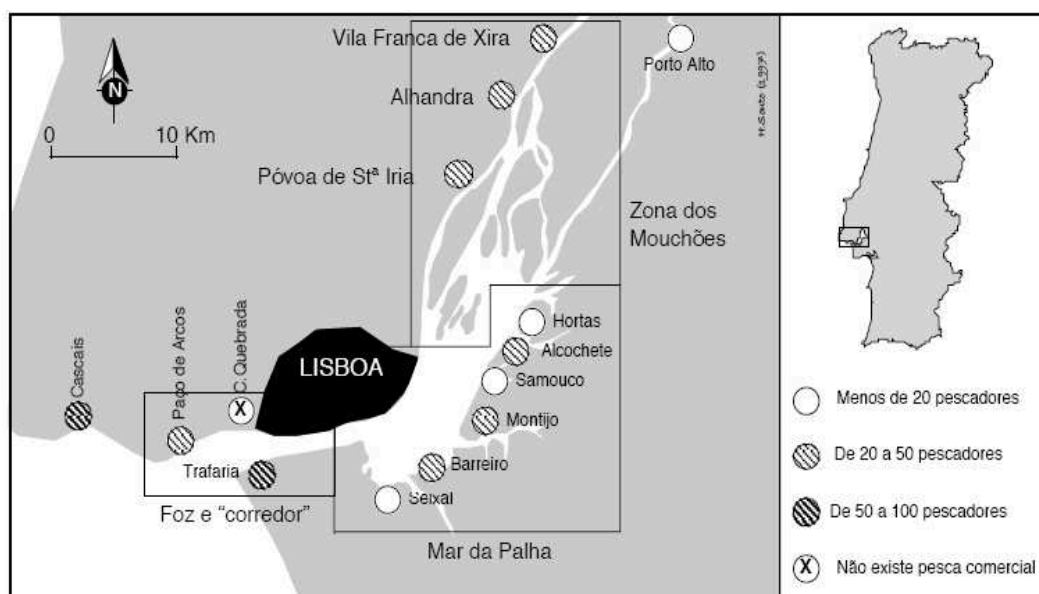


Figura 14:Localização dos “portos” e dos principais ancoradouros de pesca no estuário do Tejo (1998) (Souto, 2001).

2.4.2. Problemática ambiental

Os estuários têm sido desde sempre zonas preferenciais de industrialização e urbanização, não só pelas facilidades de transporte e de desenvolvimento, mas também pela possibilidade de uma “diluição natural” da descarga de resíduos (Spencer, 2002). Sendo a área Metropolitana de Lisboa a zona mais povoada do país, este sistema salobro, tem sido sujeito a fortes impactos antropogénicos relacionados com o crescimento industrial, urbanização, agricultura e actividades portuárias e piscatórias, sendo a contaminação por metais pesados um problema recorrente (Cabral *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2007).

Actualmente o fenómeno de eutrofização permite aumentar a flora alóctone, afecta o ecossistema e deteriora a qualidade da água. Outra problemática é a presença de compostos químicos tóxicos, como os fitofarmacêuticos e os seus metabolitos, os poluentes orgânicos persistentes (POP) (como dioxinas e furanos, policlorobifenilos - PCB, policlorotrifenilos-PCT, hidrocarbonetos aromáticos policíclico-PAH) e os metais pesados. Muitos destes contaminantes químicos apresentam resistência à degradação e afinidade para os tecidos adiposos. Desta forma são bioacumuláveis o que aumenta o risco para o Homem, que se alimenta de organismos provenientes do sistema estuarino como os bivalves (Mann, 1979; Phillips, 1977),.

Em termos microbiológicos o estuário do Tejo é considerado uma zona de Classe C onde os bivalves podem ser apanhados e destinados à transposição prolongada (mínimo dois meses) ou à transformação em unidades industriais.

2.5. Moluscos bivalves no estuário do Tejo

Segundo Silva *et al.* (2008) o termo molusco bivalve designa o animal de corpo mole protegido por um exoesqueleto de carbonato de cálcio composto por duas valvas que se articulam por uma charneira e são mantidas unidas pelos músculos adutores. Nos bivalves, contrariamente a outros moluscos, não é possível distinguir a cabeça. O corpo é constituído por um pé e uma série de lâminas branquiais (ctnedia), podendo ou não existir um par de sífões.

O manto tem a forma de duas abas simétricas que recobrem o corpo do animal e segregam as valvas. Estas podem ser firmemente fechadas por retracção dos músculos adutores, situados em cada uma das extremidades do animal (Figura 15). Os bivalves não possuem um sistema muscular que permita a abertura das valvas. Em vez disso possuem um ligamento elástico que abre automaticamente a concha quando o músculo adutor relaxa. Ao longo da charneira existe uma espécie de cremalheira que mantém as valvas da concha no lugar e evita que se desloquem para trás ou para a frente (Silva *et al.*, 2008).

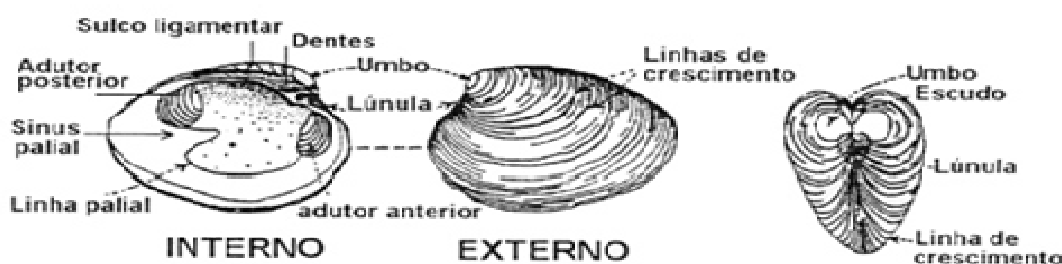


Figura 15: Esquema da constituição de moluscos bivalves. Adaptado de (<http://fossil.uc.pt/>).

Os bivalves filtram uma grande quantidade de água que entra na cavidade palial e banha as brânquias onde ficam retidos microrganismos e partículas orgânicas que se encontram em suspensão. As brânquias são constituídas por dois pares de lâminas de cada lado do pé que possuem pequenos filamentos, os cílios, que conduzem a corrente de água para a cavidade do manto. Nas espécies que se enterram no sedimento, as margens do manto estão unidas e a entrada e saída da corrente de água é feita através de dois sífões (um inalante e outro exalante). As partículas retidas são transportadas até à boca por um muco pegajoso, sendo depois digeridas ao longo do tracto di-

gestivo. O material digerido concentra-se nalguns órgãos, como o hepatopâncreas e a glândula digestiva (Silva *et al.*, 2008).

Os principais factores ambientais que afectam os processos biológicos e a actividade dos bivalves são a temperatura, luz, salinidade, quantidade de oxigénio dissolvido na água, natureza do fundo e movimento das águas que influenciam (Silva *et al.*, 2008).

Por exemplo, se a temperatura aumenta, o metabolismo torna-se mais intenso, aumenta o movimento ciliar e, conseqüentemente, a quantidade de água bombeada e o ritmo respiratório. A abertura máxima das valvas acontece por volta dos 20 °C e a actividade das brânquias é insignificante entre os 3 °C e os 8 °C, sendo máxima entre 25 °C e 30 °C (Silva *et al.*, 2008). As temperaturas elevadas promovem uma maior actividade metabólica, através da introdução de volumes acrescidos de água palial, maior consumo de oxigénio e alimento (Silva *et al.*, 2008).

No estuário do Tejo existem diversas espécies de bivalves, como sejam, a amêijoja-japonesa (*Ruditapes philippinarum*), amêijoja-boia (*Ruditapes decussatus*), amêijoja-macha (*Venerupis pullastra*), berbigão (*Cerastoderma edule*), lambujinha (*Scrobicularia plana*), lingueirão (*Solen marginatus*), mexilhão (*Mytilus edulis*), navalha (*Pharus legumen*) e ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*) (Silva *et al.*, 2008).

A amêijoja-macha, amêijoja-japonesa, lambujinha e mexilhão são actualmente usados como indicadores do teor em bactérias fecais, nomeadamente a *Escherichia coli*. A apanha da lambujinha, para o consumo humano, encontra-se presentemente proibida no estuário do Tejo devido aos recorrentes teores elevados de chumbo.

2.5.1. Amêijoa-japonesa

Nome vulgar: Amêijoa-japonesa

Outras designações: ING-Manila clam; FR-Palourd griesse japoniese; ESP- Almeja japónica.



Figura 16: Amêijoa-Japonesa

Espécie: *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1848)

Família: Veneridae

Morfologia: Concha sólida, equivalve, ovóide e quadrangular, apresentando a margem posterior quase recta. As valvas são simétricas, com costelas serradas concêntricas e radiais, mas com o padrão reticulado menos apertado e mais marcado do que em *Ruditapes decussatus*, a espécie congénere nativa de Portugal. A charneira tem três dentes cardinais em cada valva, mas não tem dentes laterais (FAO, 2011a).

O seio palial é profundo e arredondado, sem chegar ao centro da valva. O bordo das valvas é liso. A cor da concha é muito variável, mas geralmente acastanhada, decorada com desenhos diversos, apresentando frequentemente grandes manchas ou bandas escuras concêntricas ou irregulares. O interior é esbranquiçado; ocasionalmente de cor púrpura na região próxima ao umbo (Rodríguez-Moscoso *et al.*, 1992).



Figura 17: Morfologias da amêijoa-japonesa.

Dimensão: Pode atingir até 8 cm de comprimento (FAO, 2011a).

Biologia: É uma espécie estritamente gonocórica (FAO, 2011a). O período de reprodução varia de acordo com a área geográfica, mas normalmente existe um período de repouso sexual finais do final do Outono até ao início do Inverno

(FAO, 2011a). A gametogénese no meio natural dura dois a cinco meses, seguidos da reprodução. Pode haver um segundo pico de desova dois a três meses mais tarde (Rodríguez-Moscoso *et al.*, 1992). A temperatura e a disponibilidade alimentar são dois parâmetros que afectam a gametogénese, que ocorre mais rapidamente com o aumento da temperatura (FAO, 2011a; Ohba, 1959). Embora a temperatura óptima se situe entre os 20 e 22 °C, a temperatura mínima para se iniciar o processo de gametogénese é de 8 °C, sendo 12 °C o limite inferior para a maturação dos gâmetas e 14 °C o limite inferior para a desova (Holland & Chew, 1974; Mann, 1979; Xie & Burnell, 1994).

Habitat: Esta espécie vive enterrada a cerca de 4 cm da superfície, em sedimentos arenosos e vasosos das zonas intertidais e subtidais (Lee, 1996).

É um organismo eurialino que ocorre na região interior dos estuários, suportando salinidades entre 16 ‰ e 36 ‰, sendo o seu óptimo halino de 20 ‰ a 26 ‰. (FAO, 2011a).

Distribuição geográfica: Encontra-se distribuída pelas regiões subtropicais e boreais, sendo oriunda das latitudes baixas do Pacífico oriental (Rodríguez-Moscoso *et al.*, 1992). As populações indígenas encontram-se nas Filipinas, nos mares do sul e leste da China, Mar Amarelo, Mar do Japão, Mar de Okhotsk e ilhas Curilhas do Sul (Xie & Burnell, 1994).

Pesca e comercialização: Capturada pelo uso de técnicas de arrasto nomeadamente a ganchorra. Tamanho mínimo de captura 40 mm. Esta espécie encontra-se estabelecida satisfatoriamente em várias regiões do Mundo, longe dos limites da sua distribuição geográfica natural (Melià & Gatto, 2005).

A sobrepesca e os rendimentos irregulares de amêijoas nativas europeias, como a amêijoia-bola (*Ruditapes decussatus*), geraram a importação de *R. philippinarum* para a Europa (FAO, 2011a). A amêijoia-japonesa tem apresentado ao longo do tempo uma excelente adaptação ao estuário do Tejo, existindo em quantidades extremamente elevadas. A maior abundância desta espécie foi registada junto ao Montijo, embora presentemente o maior rendimento de pesca ocorra junto à da ponte Vasco da Gama (Gaspar, 2010). A colonização do estuário do Tejo por esta espécie coincidiu com uma diminuição significativa de amêijoia-bola, que ocupa o mesmo tipo de habitats, pelo que surgiram, diversas hipóteses para explicar este facto:

1. Constante exploração da amêijoia-boia levou à introdução da amêijoia-japonesa no Tejo, tendo a sua boa adaptação impedido a recuperação das populações da espécie autóctone (Gaspar, 2010);
2. Competição entre as duas espécies pelos mesmos habitats e alimentação poderá ter provocado o declínio da amêijoia-boia (Gaspar, 2010);
3. Os níveis de cádmio no estuário do Tejo podem ser uma condicionante na reprodução da amêijoia-boia, pois alguns estudos demonstram a actuação deste metal como disruptor endócrino afectando o ciclo gametogénico desta espécie (Smaoui-Damak *et al.*, 2006), mas não afectando a amêijoia-japonesa por apresentar uma maior capacidade adaptativa (Shin *et al.*, 2002).

A possibilidade de pesca de amêijoia-japonesa no estuário do Tejo surgiu com a publicação da Portaria 1228/2010, de 6 de Dezembro. A publicação da Portaria 85/2011, de 25 de Fevereiro, proibiu a apanha de amêijoia-boia e permitiu o estabelecimento de um plano de exploração da amêijoia-japonesa, que não excedesse o número de licenças emitidas. Este diploma estipulou ainda a interdição da devolução ao meio natural de exemplares de amêijoia-japonesa que não sejam colocados no circuito comercial noutras zonas que não sejam a sua área de distribuição no estuário do Tejo.

Actualmente, a problemática reside na apanha ilegal de amêijoia-japonesa, por pescadores/apanhadores não licenciados, pois esta espécie é vista como um negócio rentável e livre de impostos. No entanto estes organismos representam um risco de saúde pública, pois a amêijoia geralmente não é depurada quando é vendida no mercado local, e uma grande parte seja enviada para Espanha onde é ilegalmente depurada e mais tarde comercializada. Apesar da Polícia Marítima reforçar continuamente a sua fiscalização e aplicar multas aos infractores, a sua actuação é ainda ineficaz para impedir este mercado paralelo.

2.5.2. Lambujinha

Nome vulgar: Lambujinha

Outras Designações: ING - Peppery furrow shell; FR- Lavgnon poivre; ESP- Almeja de perro.

Espécie: *Scrobicularia plana* (Linneus, 1758)

Família: Semelidae

Morfologia: Concha sólida, ovalar e quase equilátera. Valvas semelhantes com linhas concêntricas, estrias de crescimento irregulares, charneiras com dois dentes na valva esquerda e um na direita. Cor exterior cinzento-amarelo pálida e interior branco (Silva *et al.*, 2008).



Figura 18: Lambujinha.



Figura 19: Lambujinha com os sifões estendidos. Adaptado de (<http://www.arkive.org>).

Dimensão: Em média 40 mm com um máximo referido 65 mm (Silva *et al.*, 2008).

Biologia: Espécie bissexuada é frequente encontrar indivíduos hermafroditas, e a época de reprodução ocorre no verão (Silva *et al.*, 2008). A *S. plana* é um bivalve detritívoro, alimentando-se por filtração a partir de depósitos ricos em matéria orgânica na película de água na interface com o sedimento estendendo o sifão até à superfície (Hughes, 1969; Guerreiro, 1991). A dimensão óptima das partículas alimentares é entre 4 a 40 µm, sendo mais elevada entre 24 e 25 °C (Guerreiro, 1991). Ao efectuar movimentos com os seus sifões, a lambujinha faz marcas em forma de estrela no sedimento o que facilmente as permite detectar (Silva *et al.*, 2008).

Habitat: Vivem enterrados no sedimento até uma profundidade de cerca de 25 cm, distribuindo-se em agregados que formam manchas descontínuas (Hughes, 1970). A distribuição dentro dos agregados apresenta-se uniforme e aleatória, não reveladora de um comportamento territorial (Guerreiro, 1991). Esta espécie é frequente em águas de salinidade baixa, com detritos orgânicos e em sedimentos de vasa arenosa e areia vasosa (Silva *et al.*, 2008).

Distribuição geográfica: Atlântico Nordeste e Mediterrâneo. Comum no litoral Português em particular na ria de Aveiro e estuário do Tejo (Silva *et al.*, 2008).

Pesca e comercialização: Captura-se com ganchorra de mão ou rebocada por embarcações ou com faca de mariscar. Tamanho mínimo de captura 25 mm. Comercializa-se normalmente em fresco (Silva *et al.*, 2008).

2.5.3. Mexilhão

Nome vulgar: Mexilhão

Outras Designações: INC- mussel; FRA- Moule commune; ESP- Mejillón común.

Espécie: *Mytilus* sp.

Família: Mytilidae



Figura 20: Mexilhão.

Morfologia: Concha sólida, equivalve e inequilateral, cilindróide aproximadamente triangular. Bordo ligamentar ligeiramente encurvado. A superfície da concha é lisa, com grande número de estrias de crescimento concêntricas, charneira desprovida de dentes; vértices terminais (Silva *et al.*, 2008). Marca do músculo adutor anterior pequena e a do posterior larga. Margens internas lisas. Possui 3 e 12 pequenas crenulações (Silva *et al.*, 2008). Coloração exterior das valvas é negra, azulada ou violácea escura. Internamente a concha é branca. Perióstraco opaco, castanho-esverdeado ou negro (Silva *et al.*, 2008). Os mexilhões possuem bisso para se fixarem ao substrato através de feixes de filamentos que são secretados por um conjunto de glândulas bissogénicas que se localizam no interior do pé (Silva *et al.*, 2008).

Dimensão: 30 a 140 mm (Silva *et al.*, 2008).

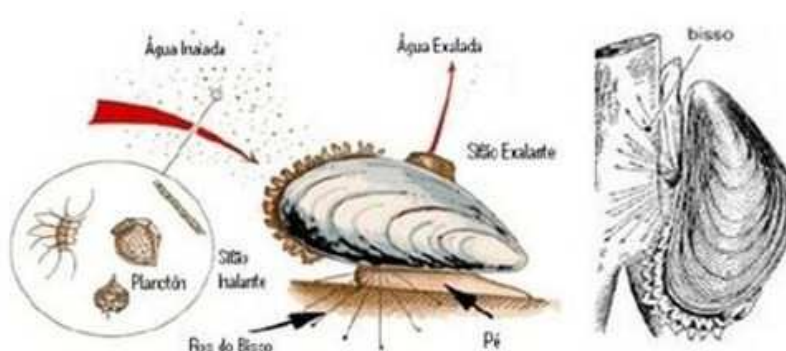


Figura 21a : Uso das válvulas. Adaptado de (<http://www.weichtiere.at/>). 21b – Mexilhão fixado a substrato pelo uso do bisso.

Biologia: Organismo unissexual, i.e. que possui apenas um sexo. A fecundação é externa ocorrendo na água onde são depositados os ovos e os espermatozóides (Silva *et al.*, 2008).

O tempo de incubação depende da temperatura, podendo variar entre 1 a 2 semanas. Depois deste período nasce a larva planctónica que ao fim de cerca de 20 dias segrega uma concha transparente e rudimentar, e fixa-se ao substrato (Silva *et al.*, 2008)

O período de reprodução vai desde entre Março, e Outubro com dois picos, um na Primavera e outro no Outono, sendo o primeiro mais intenso. São animais filtradores que se alimentam de pequenas partículas orgânicas em suspensão (Silva *et al.*, 2008).

Habitat: É muito abundante em todo o litoral, bem como em águas estuarinas. Podem viver em águas poluídas como nas áreas portuárias (Silva *et al.*, 2008).

Fixa-se a diversos substratos, na zona intertidal até 40 m, formando grandes colónias. Quando as condições ambientais são adversas os mexilhões rompem os seus fios do bisso e migram, por acção das marés, até encontrarem locais mais adequados (Silva *et al.*, 2008).

Distribuição Geográfica: Muito comum em todo o litoral Atlântico e mar mediterrâneo (Silva *et al.*, 2008).

Pesca e Comercialização: O mexilhão pode ser cultivado em grande escala fixado a estacas enterradas no solo ou em cabos suspensos em jangadas. Pode também ser capturado na zona intertidal com faca de mariscar. É comercializado em fresco, congelado e em conserva. Tamanho mínimo de captura 50 mm (Silva *et al.*, 2008).

2.6. Benefícios associados ao consumo de bivalves

Os bivalves são considerados alimentos saudáveis e completos, do ponto de vista nutricional, visto apresentarem diversos nutrientes essenciais para o Homem. Além disso podem ser sujeitos a diferentes confecções culinárias, algumas bem enraizadas na gastronomia nacional (Nunes, 2008 a).

Na tabela 3 apresenta-se a composição química aproximada média da parte edível (entendida como o conjunto do miolo e do líquido intervalvar) de amêijoas, mexilhões, ostras e vieiras, os grupos de moluscos bivalves normalmente considerados com maior interesse comercial (Nunes, 2008b).

Tabela 3: Valores médios da composição química aproximada (g/100g de parte edível) do valor energético (kcal e kj/100g de parte edível) das espécies de bivalves de maior interesse comercial.

Produto	Energia (kcal/kJ/100g)	Água (g/100g)	Proteína (g/100g)	Gordura (g /100g)	Minerais (g/100g)	Glúcidos (g/100g)
Amêijoas	74 (310)	81,8	12,8	1,0	1,9	2,6
Mexilhões	86 (360)	80,6	11,9	2,2	1,6	37,0
Ostras	81 (339)	82,1	9,4	2,3	1,2	4,9
Vieiras	105 (440)	74,6	17,1	0,8	1,6	6,0

A percentagem média de proteína nos bivalves é, geralmente, inferior a 13. Em regra, o teor de proteínas não apresenta diferenças substanciais durante o ciclo de vida dos moluscos bivalves. Tem-se verificado no entanto que longos períodos de privação de alimento provocam uma diminuição do teor proteico nalgumas espécies como é o caso da ostra-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*) (Bandarra *et al.*, 2004; Nunes, 2008). As proteínas apresentam um perfil equilibrado de aminoácidos, sendo os mais abundantes a lisina, leucina e isoleucina.

O teor de cinza nos bivalves é geralmente inferior a 3 % podendo ser influenciada pela presença de partículas de areia na parte edível e no líquido intervalvar (Nunes, 2008).

Os teores dos diferentes elementos variam de acordo com as espécies, localização geográfica e ciclo reprodutor, embora se destaquem o selênio, ferro, potássio, fósforo; cálcio e magnésio (Tabela 4) (Bandarra *et al.*, 2004). Os valores recomendados de referência para os diferentes minerais encontram-se no Anexo 7 (Os bivalves são igualmente ricos em vitaminas (A, B1, B2, B6, B12 e C) (Bandarra *et al.*, 2004)

Tabela 4: Valores médios dos principais minerais (por 100g de parte edível) nas espécies de bivalves de maior interesse comercial (adaptado de www.nutrition.data.com).

Minerais (100g por parte edível)	Amêijoas	Mexilhões	Ostras	Vieiras
Cálcio (mg)	46,0	26,0	8,0	31,0
Ferro (mg)	14,0	3,9	5,1	3,2
Magnésio (mg)	9,0	34,0	22,0	48,0
Fósforo (mg)	169,0	19,7	162,0	190,0
Potássio (mg)	314,0	32,0	168,0	250,0
Sódio (mg)	56,0	28,6	106,0	301,0
Zinco (mg)	1,4	1,6	16,0	0,8
Cobre (mg)	0,3	0,1	1,6	0,2
Manganês (mg)	0,5	3,4	0,6	~0
Selénio (mg)	24,3	44,8	77,0	44,8

Os bivalves são geralmente magros (1 a 2 % de gordura), excepto no berbigão onde é frequente encontrar valores superiores a 3 % (Nunes, 2008b).

A gordura dos bivalves apresenta uma excelente qualidade pois os níveis de polinsaturados são superiores aos dos saturados, é rica em ácidos gordos polinsaturados do tipo $\omega 3$ e a relação entre os $\omega 3$ e $\omega 6$ é muito adequada a uma alimentação saudável (Bandarra, *et al.*, 2004).

No conjunto dos saturados o palmítico (16:0) é o mais comum em todas as espécies, enquanto nos polinsaturados da família $\omega 6$ destaca-se o araquidónico (ARA-20:5 $\omega 3$) e na família $\omega 3$ o eicospentaenoico (EPA-20:6 $\omega 3$) e o docosahexaenoico (DHA-22:6 $\omega 3$) (Tabela 5). Diversos estudos demonstram que uma dieta rica em ácidos gordos polinsaturados do tipo $\omega 3$ provoca diversos efeitos benéficos na saúde, prevenção cardiovascular como por exemplo um decréscimo da incidência da morte precoce, com origem no enfarte do miocárdio, redução dos níveis de colesterol e triglicérideos e da tensão arterial (Rodrigues *et al.*, 2008).

Tabela 5: Valores médios (mg/100g de parte edível) dos principais ácidos gordos nas amêijoas e berbigão produzidos em Portugal (Bandarra *et al.*, 2004).

Ácidos gordos (mg/100g de parte edível)	Amêijoas	Berbigão
16:0	138,4	399,8
Σ Saturados	223,5	678,4
18:1	25,2	57,5
Σ Monoinsaturados	119,7	610,0
ARA (20:5ω3)	17,2	45,1
EPA (20:6ω3)	58,6	593,8
DHA (22:6 ω3)	54,9	214,7
Σ Polinsaturados	264,9	1196,1
ω3	190,0	1024,7
ω6	65,7	170,0
ω3/ω6	2,9	6,0

2.7. Riscos associados ao consumo de bivalves

Apesar da excelente composição nutricional, em condições específicas os bivalves podem acumular contaminantes químicos e microbiológicos que representam riscos acrescidos para os consumidores. Estes riscos advêm da quantidade de contaminantes nos habitats dos moluscos bivalves (Stankovic & Jovic, 2011).

São conhecidas poucas substâncias químicas que estejam presentes em concentrações suficientemente elevadas nos bivalves para representar uma ameaça para a saúde pública (Huss *et al.*, 2000). Contudo, situações de exposição accidental a elevadas concentrações de contaminantes químicos traduzem-se geralmente em graves intoxicações alimentares, doenças graves como danos neurológicos, defeitos de nascimento e cancro (Huss *et al.*, 2000).

A maioria dos contaminantes químicos (ex. cádmio, mercúrio e chumbo) que atingem as zonas costeiras é adsorvida à matéria particulada e fixa-se no sedimento, onde se podem bioacumular em invertebrados bentónicos, suspensívoros ou detritívoros, se a taxa de absorção for maior do que a sua metabolização potenciando eventuais efeitos adversos a níveis complexos de organização biológica (Costa *et al.*, 2009 Lee *et al.*, 2000).

Os níveis de contaminantes químicos variam consoante as espécies de bivalves, ou mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (Bryan *et al.*, 1980). O manto e as brânquias estão em contacto directo com os metais presentes no meio circundante, sendo estes os principais meios de incorporação dos elementos dissolvidos na água (Galvão *et al.*, 2009).

Quando incorporados nestes tecidos, os metais são transportados para o interior dos bivalves, contaminando os tecidos. Os metais estão principalmente associados a proteínas citosólicas e dentro de lisossomas que se encontram na hemolinfa (Renwranz & Werner, 2007).

Por vezes a contaminação do ambiente marinho por substâncias orgânicas e inorgânicas pode afectar a sobrevivência de organismos marinhos. O grau de toxicidade de cada metal depende da espécie, tempo, via de exposição, concentração e forma química em que se encontra presente no ambiente (Klaassen & Watkins, 2001).

Alguns bivalves como a lambujinha (*S. plana*) acumulam elevadas concentrações de alguns metais pesados (ex. chumbo) na glândula digestiva, não sendo no entanto

afectados por estes poluentes. Porém, quando consumidos pelos seus predadores, esses metais são assimilados por estes, passando a níveis superiores da cadeia trófica onde podem ser prejudiciais (Brayn & Uysal, 1978).

Em comparação com os peixes e crustáceos, os bivalves apresentam baixos níveis de actividade nos sistemas enzimáticos, sendo capazes de metabolizar poluentes orgânicos persistentes (POP), como os bifenilos policlorados (PCB), pelo que a concentração de contaminantes nos seus tecidos reflectem com precisão a magnitude da contaminação ambiental (Phillips, 1977).

Existem diversos estudos que associam exposição crónica de metais pesados como o Chumbo (Pb), Cobre (Cu), e Zinco (Zn) a doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (Stankovic & Jovic, 2011). No caso dos bivalves algumas espécies como o mexilhão (*Mytilus* sp.) e a ostra-do-pacífico (*Crassostrea gigas*) acumulam metais pesados principalmente na altura de desova, demonstrando assim maiores teores de metais em estágios do desenvolvimento específicos (Carvalho *et al.*, 2001; Coimbra & Carraça, 1990).

De acordo com os mesmos autores verifica-se ainda que em algumas espécies como o mexilhão preto (*Chromytilus meridionalis*), apresenta maior concentração de metais no período de desenvolvimento das gónadas (Coimbra & Carraça, 1990; Carvalho *et al.*, 2001).

Um estudo realizado por Petroczi e Naughton (2009) concluiu que em vários países o número de casos diagnosticados a nível de intoxicações alimentares em pescado por metais pesados é esporádico, sendo influenciado pela estação do ano, nível de contaminação e localização geográfica. Estes autores salientam que a maioria dos casos diagnosticados incidiu sobre a ingestão de espadarte e tubarão com cerca de 42 % e 15%, respectivamente. No caso dos organismos marinhos, os contaminantes mais problemáticos são o Pb, Cd e Hg (Stankovic & Jovic, 2011). No entanto, existem outros elementos nestes alimentos que podem representar perigos para os consumidores, como é o caso do arsénio, cobre, etc.

Actualmente, os limites máximos de perigos químicos como o cádmio, chumbo e mercúrio admissíveis nos bivalves encontram-se regulados de modo a salvaguardar a saúde do consumidor (Tabela 6).

Tabela 6: Teores máximos admissíveis de cádmio, chumbo e mercúrio nos moluscos bivalves nos termos dos Regulamentos (CE) N.º 1881/2006 de 19/12/2006 e 629/2008 de 2/7/2009.

Teor Máximos admissíveis (mg/kg)	
Mercúrio	0,50
Chumbo	1,5
Cádmio	1,0

2.7.1. Cádmio

O cádmio (Cd) é um metal muito utilizado como anticorrosivo em aço galvanizado. É utilizado nas baterias recarregáveis de níquel-cádmio e em muitos componentes electrónicos e reactores nucleares. Encontra-se geralmente em níveis baixos no ambiente, sendo principalmente proveniente de indústrias de combustão, fertilizantes, escórias e esgotos mas também pode resultar da incineração de lixos municipais sólidos (Morel *et al.*, 2008).

As principais fontes de exposição de Cd para o Homem são sobretudo o ar, a água, os alimentos e o tabaco. Nos alimentos o teor de Cd é muito baixo com excepção dos moluscos bivalves nos quais existe um tiol não proteico (metalotionina) que se liga a este metal, levando à sua acumulação (FDA, 1993). O teor de Cd nos bivalves aumenta regularmente ao longo do ciclo de vida dado que a sua ingestão é superior à eliminação por excreção (Costa *et al.*, 2009).

Os teores de Cd nas ostras, mariscos e vegetais podem atingir entre 100 e a 1000 µg/kg enquanto a carne, peixe e frutos podem conter entre 1 a 50 µg/kg, e nas sementes varia entre 10 a 150 µg/kg (Reeves & Chaney, 2008).

Após a sua entrada no tracto gastrointestinal podem ocorrer três situações:

- Excreção, não originando acumulação;
- Ligação aos eritrócitos gerando pequenas acumulações;
- União à metalotionina gerando o complexo cádmio-metalotionina, que provoca elevadas concentrações nos órgãos ocos.

A presença de Cd no corpo humano prejudica o funcionamento de alguns tecidos, como nos do rim, afectando a função tubular proximal renal, manifestando-se um aumento do Cd na urina, proteinúria, aminoacidúria, glicosúria e diminuição da reabsorção tubular de fosfatos.

O Cd pode afectar o fígado quando ocorre em concentrações elevadas, uma vez que a saturação da metalotionina, leva que o Cd livre atinja o fígado. A concentração de Cd no fígado depende dos danos causados na função renal, diminuindo a reabsorção do complexo Cd-metalotionina e incrementando a sua excreção. Só então a concentração de Cd no fígado excede a concentração ao nível renal (Klaassen & WatkinsIII, 2001a).

O Cd afecta o metabolismo do cálcio, fósforo e vitamina D, interferindo na calcificação, descalcificação e remodelação óssea. Ao afectar o metabolismo do cálcio, fósforo e vitamina D permite que surjam determinadas patologias, particularmente a osteoporose, e a osteomalácia ou doença de Itai-Itai (Calabuig, 2004; Klaassen & Watkins, 200). A Agência Europeia de Segurança Alimentar considerou como nível máximo de ingestão semanal os 2,5 µg por quilograma de peso corporal.

2.7.2. Chumbo

O Chumbo (Pb) é o metal mais ubíquo, sendo detectado em praticamente todos os sistemas ambientais. Atinge o sistema aquático pela erosão superficial do solo ou pela deposição atmosférica sendo as maiores via de exposição os alimentos e o ar (FDA, 1993).

A absorção de Pb pela via digestiva depende principalmente de factores relacionados com o estado de jejum, ingestão de proteínas e presença de cálcio, ferro e fósforo. Uma deficiência destes nutrientes induz a absorção de Pb e vice-versa, devido à competição pelo mecanismo de transporte (Klaassen & Watkins, 2001).

Os adultos absorvem 5 a 15 % do Pb ingerido e normalmente retêm menos de 5 % do que absorvem. Sabe-se que nas crianças há maior absorção de Pb que nos adultos; sendo a absorção média de 41,5 % e a retenção atinge os 31,8 % em crianças com hábitos alimentares normais (Klaassen & Watkins, 2001).

O Pb é extraordinariamente prejudicial ao cérebro e ao sistema nervoso em geral. Afecta o sangue, rins, sistema digestivo e reprodutor, e é um agente causador de hipertensão e teratogénico (Silbergeld *et al.*, 2000).

No sistema nervoso central tende a concentrar-se na matéria cinzenta e em determinados núcleos. As maiores concentrações são no hipocampo, cerebelo, córtex cerebral e medula (Peraza *et al.*, 1998; Klaassen & Watkins, 2001).

No sistema nervoso o Pb pode provocar as seguintes alterações morfológicas:

- i. Desmielinização; ²(Araki, 2000)
- ii. Degeneração axonal; (Araki, 2000)
- iii. Bloqueio présináptico com degeneração das células de Schwann;³ (Khalil *et al.*, 2009; Araki, 2000; Greenstein & Greenstein, 2000)

² A mielina assegura o isolamento eléctrico dos processos neuronais e a sua ausência leva a uma diminuição marcada da velocidade de condução e a condução aberrante de impulsos entre processos adjacentes, chamada transmissão efáptica (Kandel & Siegelbaum, 2001).

- iv. Distúrbios nos vasos cerebrais e proliferação de células gliais⁴ nas massas cinzenta e branca (Araki, 2000; Greenstein & Greenstein, 2000; Klaassen & Watkins, 2001)

O Pb consegue ainda atravessar a barreira transplacentária e acumular-se nos tecidos fetais, incluindo no cérebro, apresentando níveis proporcionais aos encontrados no sangue materno (Klaassen & Watkins, 2001).

Normalmente o Pb encontra-se retido nos núcleos das células renais *in vivo* e *in vitro* e em células do fígado *in vivo*. É uma causa directa de danos no ADN (mutações, deleções e substituições de nucleóticos), que por sua vez têm um efeito directo de carcinogénese (Klaassen & Watkins, 2001).

Alguns estudos em animais sugerem que este metal pode afectar directamente a pressão sanguínea, alterando a sensibilidade dos músculos lisos vasculares a estímulos vasoactivos, ou alterando a função neuroendócrina das células musculares lisas (Klaassen & Watkins, 2001).

2.7.3. Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um elemento metálico que ocorre naturalmente no ambiente sendo libertado pela desgaseificação natural da crosta terrestre e oceanos e por actividades antropogénicas (Jan *et al.*, 2009; Canário *et al.*, 2010).

Existem três formas de Hg: compostos elementares, inorgânicos e orgânicos, cada um com as suas características toxicocinéticas e efeitos na saúde (WHO, 2006).

O primeiro processo envolvido na transformação do Hg em ecossistemas aquáticos é a conversão biológica em compostos orgânicos de Hg por diversas bactérias anaeróbias sulfito-redutoras (Morel *et al.*, 2008).

A baixo pH e a altas concentrações de Hg no solo ocorre a formação do metilmercúrio (MeHg) por bactérias e leveduras (WHO, 2005).

³ Células de Schwann produzem a bainha de mielina (Siegelbaum & Koester, 2001).

⁴ Células que proporcionam suporte e nutrição aos neurónios (Kandel & Siegelbaum, 2001).

Em segundo lugar ocorre na água o fenómeno de fotólise das formas orgânicas de Hg. Existe ainda a redução abiótica de Hg inorgânico para Hg elementar, que ocorre especialmente na presença de substâncias húmicas solúveis (Risher & De Rosa, 2007).

O MeHg (forma orgânica de Hg) é a forma mais importante de Hg com maior toxicidade de saúde constituindo cerca de 90 % do Hg existente no pescado (Nunes *et al.*, 2008). Os maiores efeitos para a saúde dos seres humanos provenientes da exposição ao MeHg são os efeitos neurotóxicológicos em adultos e a toxicidade para os fetos das mulheres expostas a este composto durante a gravidez (Clarkson, 2007).

A principal acção do MeHg é inibir os receptores iónicos do ácido gama-aminobutírico (GABA), que é o principal neurotransmissor inibidor do cérebro (Siegelbaum & Koester, 2001; Risher & De Rosa, 2007).

O MeHg é bioacumulado ao longo da cadeia trófica, podendo bioamplificar pela passagem para níveis trófico sucessivamente superiores (Wiener *et al.*, 2003; Chapman & Chan, 2000). As aves e mamíferos que se alimentam à base de peixes estão mais expostos ao (MeHg) do que qualquer outro animal no ecossistema aquático (EPA, 1997). A absorção do Hg dos alimentos ao nível gastrointestinal é de cerca de 15 %, enquanto a absorção do MeHg é de cerca 90 % (Klaassen & Watkins, 2001; Vries, 1996).

Quando o MeHg está presente em concentrações baixas, não representa um perigo toxicológico para os consumidores. Todavia a sua acumulação a longo prazo pode ser prejudicial, pois é eliminado muito lentamente pelo organismo humano (Nunes *et al.*, 2008).

No caso do Hg inorgânico estudos recentes demonstram que a glândula pituitária é o seu principal alvo depositando-se no cérebro. Foi descoberto que a hormona luteinizante produzida por esta glândula apresenta uma rara afinidade para se ligar ao Hg.

A sua estrutura contém uma subunidade beta que tem afinidade para ligar-se ao Hg de forma quase irreversível, tornando-se assim um elemento neurotóxico (Laks, 2009).

O rim é de igual modo um órgão que apresenta grande sensibilidade para o I-Hg, podendo causar necrose tubular aguda e glomerulonefrite imunológica (Klaassen & Watkins, 2001). O Hg elementar não é significativamente absorvido ou transformado pelo sistema digestivo humano quando ingerido, sendo pouco tóxico para o organismo e quase completamente excretado nas fezes (Rowland *et al.*, 1997; WHO, 2008).

Actualmente PTWI (*Provisional Tolerable Weekly Intake*) estabelecido para o mercúrio elementar e inorgânico é de 0,004mg/kg peso corporal e 0,0016 mg/kg para o MeHg.

3. Materiais e Métodos

3.1. Colheita das Amostras em meio natural

No mês de Março de 2012 foi efectuada a colheita de amostras em três locais do estuário do Tejo, destes bivalves foram utilizados 150 indivíduos de cada espécie na quantificação dos teores dos contaminantes, minerais e medições biométricas. No controlo da mortalidade foram utilizados 100 indivíduos de cada espécie, isolados em sacos devidamente selados.

Os mexilhões foram recolhidos na maré baixa na Praia de Algés região a jusante do estuário (Figura 22).

A amêijoia-japonesa foi apanhada por pescadores profissionais de Alcochete no corpo central do estuário.

A lambujinha foi capturada por um pescador no Sítio das Hortas, no concelho de Alcochete pertencente à Reserva Natural do Estuário do Tejo (Figura 23). É uma região sapal com vegetação halonitrófila, constituída por áreas lodosas interditais, intercaladas por zonas de areias.

Os animais foram transportados numa arca térmica a 4 °C até ao Laboratório Marítimo da Guia, Centro de Oceanografia da Faculdade de Ciências, onde se realizou a contagem do número de indivíduos de cada espécie.

Em seguida, retiram-se 30 exemplares de cada espécie de modo a constituir o primeiro ponto de amostragem, estes sem o efeito da depuração.

Os restantes exemplares foram sujeitos à depuração onde em cada ponto de amostragem eram removidos 30 indivíduos ao acaso de cada espécie para constituir os vários pontos de amostragem.

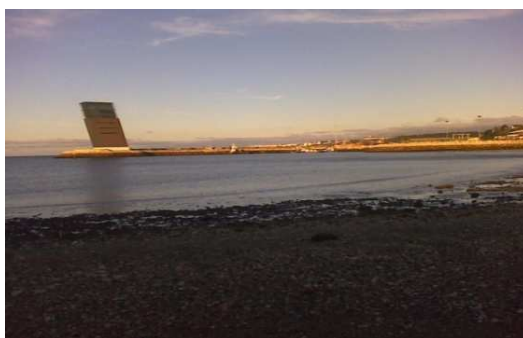


Figura 22: Praia de Algés.

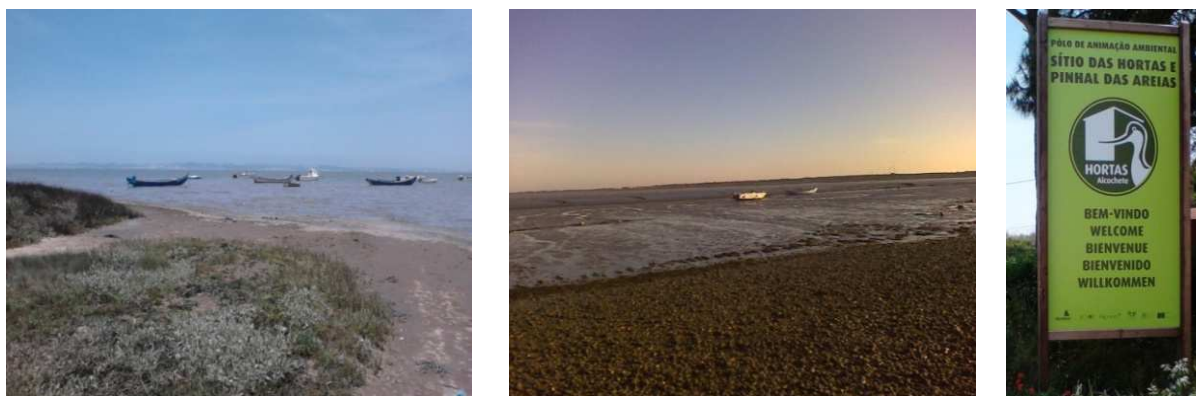


Figura 23: Sítio das Hortas em Alcochete.

3.2. Amostragem durante a depuração

Foram preparados três tanques com 15 L de capacidade, com sistema de refrigeração e arejamento da água, em circuito fechado com filtro biológico bombeando e escumador, sendo renovada a água do mar com um volume de reposição de 2.9 L min⁻¹.

A temperatura da água mantida a 17,6 °C, salinidade a 35 ‰ e pH 6,98. A água foi esterilizada em permanência com recurso a lâmpadas UV.

Em cada tanque foram colocados 120 exemplares de cada espécie e iniciou-se o período de depuração com uma duração total de 16 dias. Durante este período não foi fornecida qualquer alimentação aos bivalves.

Os parâmetros físicos-químicos da água dos tanques foram monitorizados diariamente, e contabilizados os animais mortos e moribundos.

De 4 em 4 dias foram removidos aleatoriamente, 30 indivíduos de cada espécie, obtendo-se um total de 4 pontos de amostragem para cada espécie.

Em cada ponto de amostragem registou-se os dados biométricos dos indivíduos de cada espécie, recolheu-se o miolo e músculo adutor dos bivalves em placas de Petri (miolo) e tubos de plástico (músculo adutor) devidamente identificados para posterior análise.

Foram constituídos 2 pools de animais, ou replicados por ponto de amostragem.

Seguidamente congelaram-se as amostras a -80°C , e posterior liofilização a uma temperatura de -45°C e pressão de 10^{-1} mbar durante 48 h. Após a liofilização as amostras foram maceradas num almofariz e preservadas a -80°C até serem analisadas.

3.3. Determinação dos metais pesados

3.3.1 Chumbo e Cádmio

Os teores de chumbo e cádmio foram determinados por espectrofotometria de absorção atómica de chama segundo os métodos descritos respectivamente por Jorhem (2000) e na Norma Europeia EN 14084, (2003) de acordo com a abordagem descrita detalhadamente no Anexo 10, e utilizando um espectrofotómetro Varian Spectra AA 55B. As amostras liofilizadas (cerca de 2 g) foram incineradas durante a noite, seguidas de solubilização em ácido nítrico e após diluição da amostra procedeu-se à leitura em duplicado do teor do Cd e Pb por absorção atómica de chama. Cada amostra foi lida em duplicado e os resultados foram expressos em mg/kg.

3.3.2 Determinação do mercúrio total

A determinação do teor de mercúrio total foi baseada no método descrito pela Environment Protection Agency (EPA, 2007). O teor de Hg foi determinado por espectrometria de absorção atômica, utilizando um aparelho Leco Advanced Mercury Analyser AMA 254, que usa a técnica de geração de vapor de Hg.

O procedimento é baseado na decomposição da amostra liofilizada por aquecimento (cerca 10 mg em duplicado por cada dia de amostragem) e arrastamento do mercúrio libertado sob a forma de vapor que é arrastado por uma corrente de oxigénio até à célula do espectrofotómetro e leitura da absorção no comprimento de onda de 253,7 nm. O método encontra-se descrito pormenorizadamente no Anexo 9.

Cada amostra foi lida em duplicado e os resultados foram expressos em mg/kg.

3.4. Teor de glicogénio

O glicogénio foi determinado nas amostras liofilizadas de músculo adutor de acordo com o método descrito por (Viles & Silverman, 1949) e detalhadamente apresentado no Anexo 11. Este método baseia-se na reacção de hidrólise do ácido sulfúrico concentrado sobre glúcidos. A reacção decorre sobre as ligações glicosídicas que são hidrolisadas, e os açúcares simples desidratados formam um composto hidroximetilfurfural (HMF). Esse composto condensa a antrona (9-10-di-hidro-9-oxoantraceno) dando um produto de coloração azul que pode ser quantificado por espectrofotometria com comprimento de onda de 620 nm. Todas as determinações foram feitas em triplicado para cada ponto de amostragem para todas as espécies em estudo e os resultados foram expressões em mg/100 g.

3.5. Teor de macro e micro elementos

O teor de macro e micro elementos (S, Ca, K, Cl, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb e Sr) foi determinado por espectroscopia dispersiva por fluorescência de raios-X (EDXRF), baseado na metodologia descrita por Carvalho, *et al.* (2002) no laboratório do Centro de Física Atómica (secção de Física Atómica Experimental) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Todas as determinações foram realizadas em duplicado para cada dia de amostragem de cada espécie e os resultados foram expressos em mg/kg. Todo o procedimento encontra-se descrito detalhadamente no Anexo 12.

3.6. Tratamento dos dados

Neste estudo, todos os resultados obtidos foram tratados estatisticamente com o apoio dos seguintes programas: Microsoft® Excel 2010 e Statistica® 8.0.

Dada a natureza dos dados, foram utilizados dois tipos de análises e um nível de significância de 0,05. A regressão linear foi utilizada para testar a existência de correlação entre os diversos parâmetros biométricos de cada espécie.

A análise de variâncias (ANOVA) foi utilizada para determinar a existência de diferenças significativas ou não entre os teores de glicogénio, elementos contaminantes, macro e micro presentes em cada espécie, bem como, no peso edível dos indivíduos ao longo da depuração.

Nos casos em que se verificava a ocorrência de diferenças, utilizou-se o teste Tukey. De forma a garantir a validade dos testes para os dados recolhidos, foram analisados previamente os pressupostos da análise de variâncias, i.e. a homogeneidade de variâncias (teste de Levene) e a normalidade dos resíduos (teste de Kolmogorov-Smirnov).

Na maioria dos casos os pressupostos da análise de variâncias foram respeitados, excepto no teor de cálcio na lambujinha, teor de cobre na amêijoia-japonesa e peso edível nas três espécies. Nestes casos procedeu-se ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas que permitiu localizar as diferenças significativas para estes casos.

4. Resultados e discussão

4.1. Dados biométricos

Os valores obtidos relativamente aos parâmetros biométricos dos bivalves em estudo na sua condição inicial apresentam-se na Tabela 7. A tabela de correlações entre estas características biométricas encontra-se na Tabela 8.

Tabela 7: Valores médios iniciais e desvio-padrão para a amêijoia japonesa (n=15), mexilhão (n=15) e lambujinha (n=15).

	Mexilhão	Amêijoia-japonesa	Lambujinha
Comprimento (mm)	57,64 ± 7,42	51,39 ± 5,00	44,47 ± 3,59
Largura (mm)	22,89 ± 2,07	26,36 ± 3,43	13,44 ± 0,93
Altura (mm)	31,65 ± 2,20	37,25 ± 4,10	34,10 ± 2,42
Massa Total (g)	19,60 ± 4,14	32,85 ± 11,58	11,36 ± 2,81
Massa Edível (g)	9,34 ± 2,89	14,73 ± 4,72	6,65 ± 1,29
Percentagem de massa edível	48%	45%	59%

Nas amostras respectivas ao mexilhão a correlação mais elevada verificou-se entre o peso total e o peso edível ($r \approx 0,58$). Os restantes parâmetros biométricos revelaram correlações inferiores ($0,25 < r < 0,4$).

No caso da amêijoia-japonesa observaram-se correlações mais elevadas ($r > 0,85$) entre o peso edível e as restantes características biométricas. De entre estas a largura foi aquela que demonstrou uma melhor correlação com o peso edível ($r \approx 0,91$).

Quanto aos dados relativos à lambujinha, as correlações também foram elevadas ($r > 0,85$) entre o peso edível e as outras características biométricas estudadas. Neste caso, largura e peso total foram as características com correlação mais elevada com o peso edível ($r \approx 0,95$).

No mexilhão não se observou uma relação linear ($p > 0,05$) entre o tempo de depuração e o peso edível.

No caso da amêijoia-japonesa os dados revelaram uma correlação negativa ($r = -0,29$) entre o tempo de depuração e o peso edível. No entanto não se observou relação linear entre o peso total e o tempo de depuração ($p > 0,05$), o que leva a dar pouca importância à correlação anterior.

Nas amostras de lambujinha não se verificou uma relação linear entre o tempo de depuração e o peso edível.

Assim, as amostras estudadas não registaram alterações relevantes no peso edível ao longo do tempo. Assim não se diminuiu a quantidade de alimento que estes animais proporcionam.

Tabela 8: Correlações entre características biométricas.

Mexilhão						
	Dia	Comprimento	Largura	Altura	Peso Total	Peso Edível
Dia	1,00	-0,19	-0,22	-0,30	-0,18	0,02
Comprimento	-0,19	1,00	0,64	0,68	0,73	0,30
Largura	-0,22	0,64	1,00	0,56	0,74	0,36
Altura	-0,30	0,68	0,56	1,00	0,71	0,36
Peso Total	-0,18	0,73	0,74	0,71	1,00	0,58
Peso Edível	0,02	0,30	0,36	0,36	0,58	1,00
Amêijoia-japonesa						
	Dia	Comprimento	Largura	Altura	Peso Total	Peso Edível
Dia	1,00	-0,36	-0,33	-0,32	-0,22	-0,29
Comprimento	-0,36	1,00	0,85	0,87	0,82	0,87
Largura	-0,33	0,85	1,00	0,87	0,83	0,91
Altura	-0,32	0,87	0,87	1,00	0,84	0,90
Peso Total	-0,22	0,82	0,83	0,84	1,00	0,86
Peso Edível	-0,29	0,87	0,91	0,90	0,86	1,00
Lambujinha						
	Dia	Comprimento	Largura	Altura	Peso Total	Peso Edível
Dia	1,00	-0,27	-0,26	-0,28	-0,32	-0,22
Comprimento	-0,27	1,00	0,86	0,93	0,92	0,86
Largura	-0,26	0,86	1,00	0,84	0,93	0,95
Altura	-0,28	0,93	0,84	1,00	0,91	0,86
Peso Total	-0,32	0,92	0,93	0,91	1,00	0,95
Peso Edível	-0,22	0,86	0,95	0,86	0,95	1,00

Um caso notório particular observado na recolha dos bivalves foi a presença de caranguejos de dimensões reduzidas no interior dos mexilhões amostrados possivelmente,

pertencentes à espécie *Pinnotheres Pisum* (Silva, *et al* 2009). Estes indivíduos são denominados vulgarmente por caranguejo ervilha do mexilhão (Figura 24) e desenvolvem uma actividade parasitária com o seu hospedeiro. Geralmente, mexilhões que apresentam caranguejos parasitas, apresentam baixos níveis de filtração e consumos de oxigénio, que podem influenciar a sua capacidade metabólica (Silva, *et al* 2009).

Desta forma, as condições fisiológicas do mexilhão podem ter sido comprometidas pela presença deste parasita

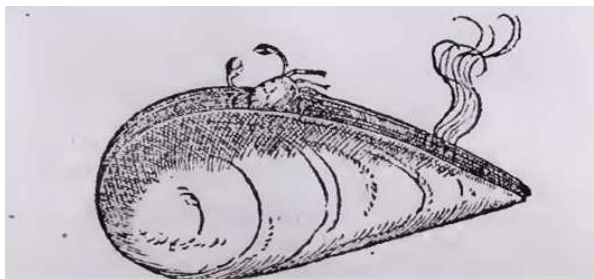


Figura 24: Mexilhão com presença de caranguejo ervilha.

Durante a depuração a lambujinha foi a espécie em que se verificou uma maior taxa de mortalidade (11 %).

Esta mortalidade poderá ser atribuída à reduzida capacidade de adaptação deste bivalve às condições da depuração. No caso do mexilhão verificou-se uma taxa de mortalidade reduzida, (0,2 %, enquanto na amêijoia-japonesa não ocorreu nenhuma mortalidade.

4.2. Glicogénio

O glicogénio é geralmente a reserva energética dos bivalves (Ackman, 1995). O músculo adutor é um ligamento que permite as válvulas dos bivalves permanecerem fechadas, sendo também um órgão de reserva energética útil (Beltrán-Lugo *et al.*, 2006). Assim quando se regista alteração na composição deste músculo é possível prever a condição fisiológica dos bivalves, isto porque quando existem decréscimos na componente principal do músculo adutor, diminui a capacidade de reter água no interior da concha (Beltrán-Lugo *et al.*, 2006).

Em relação aos bivalves estudados, os teores de glicogénio revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si (Figura 25). A lambujinha demonstrou ter o maior teor de glicogénio ($19,36 \pm 0,98$ mg/100g) no início da experiência, seguido da amêijoja-japonesa, ($9,87 \pm 0,57$ mg/100g e o mexilhão ($5,03 \pm 0,18$ mg/100g).

No mexilhão e lambujinha verificaram-se reduções significativas no teor de glicogénio ($p < 0,05$) após oito dias de depuração, caindo o teor de glicogénio no músculo adutor destas espécies para cerca de metade do valor inicial.

No caso da amêijoja-japonesa os dados demonstraram que ao longo da depuração não ocorreram variações significativas ($p > 0,05$) no teor de glicogénio, apesar de ter ocorrido um ligeiro decréscimo. No entanto, estudos anteriores reportam um decréscimo de 75 % glúcidos em juvenis de *R. philippinarum* ao longo de um período de privação de alimento de 35 dias (Albentosa *et al.*, 2007).

Quando ocorre a privação de nutrientes o balanço metabólico decresce e as reservas energéticas do corpo são utilizadas para manter o balanço. Desta forma o consumo de glúcidos e lípidos aumenta, sendo estes necessários para compensar a falta de alimento e manter a homeostasia do corpo dos indivíduos (Livingstone & Bayne, 1977).

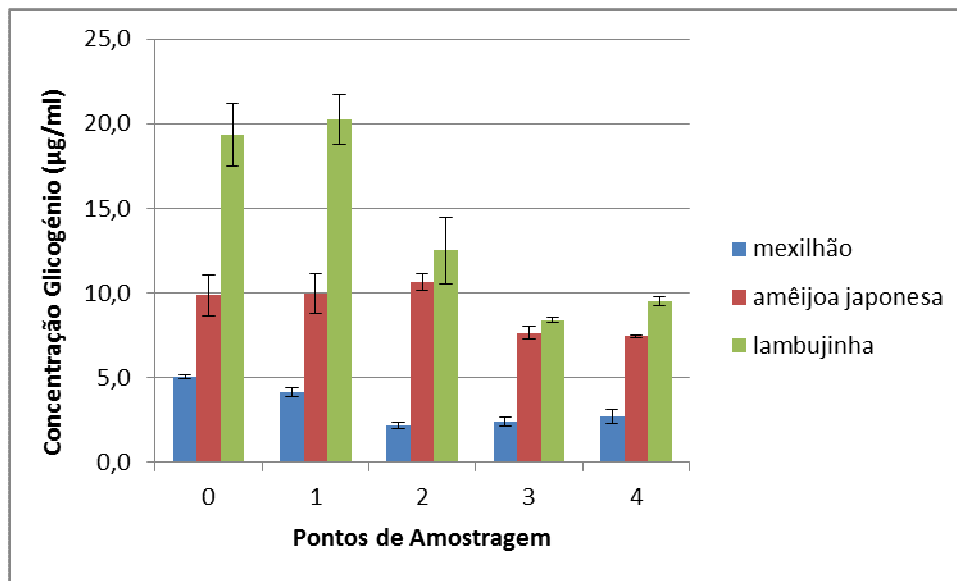


Figura 25: Concentração de glicogénio nas três espécies bivalves durante a depuração.

Deste modo verifica-se que a condição dos bivalves estudados ao longo do tratamento se deteriorou, de forma drástica na lambujinha e no mexilhão, o mesmo não ocorrendo para a amêijoia-japonesa.

4.3. Influência da depuração no teor de metais contaminantes

Neste estudo notaram-se valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) nos teores dos metais contaminantes entre as três espécies de bivalves.

A lambujinha foi a única espécie que ultrapassou o limite máximo legislado para o de Pb (1,50 mg/kg) (Nunes *et al.*, 2008) no início da depuração, com um teor de $1,621 \pm 0,002$ mg/kg (Figura 26).

Ao longo da depuração o teor de Pb diminuiu de forma progressiva na lambujinha, tendo sido detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) a partir do oitavo dia de depuração quando atingiu um valor de $(0,93 \pm 0,01)$ mg/kg (bem abaixo do limite estabelecido). O teor de Pb continuou a diminuir até ao último dia da depuração, atingindo os $0,646 \pm 0,3$ mg/kg.

De igual forma na amêijoia-japonesa o teor de Pb desceu de forma significativa ($p < 0,05$) logo nos primeiros quatro dias, variando de $0,273 \pm 0,041$ mg/kg para 0,093 mg/kg, mantendo os valores baixos até ao final da experiência.

No mexilhão não foram registadas diferenças significativas ao longo da depuração ($p > 0,05$), mantendo-se sempre entre 0,25 e 0,30 mg/kg.

Estes dados estão de acordo com outros estudos, em que alguns metais tóxicos como o Pb na espécie amêijoia-zebra (*Paphia undulata*) depois de 24 h de depuração demonstram um decréscimo significativo na ordem de 23% (El-Gamal, 2011).

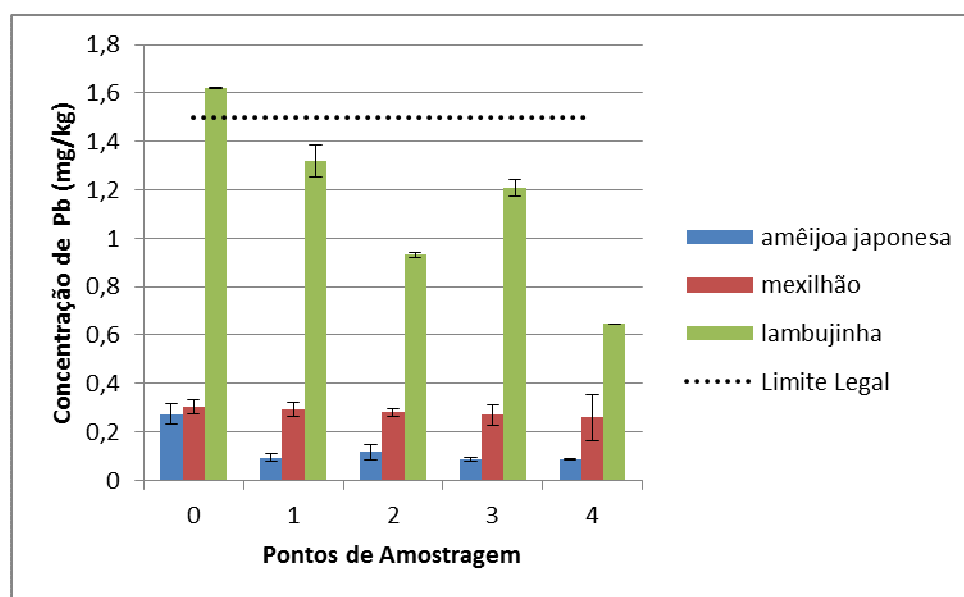


Figura 26: Teores médios de chumbo \pm desvio-padrão (mg/kg) nas três espécies, ao longo do tempo de depuração.

Quanto ao teor de Cd, as espécies de bivalves em estudo não demonstraram diferenças significativas ($p > 0,05$) ao longo da depuração. No entanto, o teor de Cd manteve-se sempre abaixo do teor permitido por lei: 1,0 mg/kg (Figura 27), apesar das concentrações de Cd nas zonas interditas sapais do estuário do Tejo serem actualmente cerca de 23 vezes mais elevadas quando comparadas com valores pré-industriais (França *et al.*, 2005).

A amêijoia-japonesa apresentou inicialmente o maior teor de Cd ($0,17 \pm 0,04$ mg/kg), seguido do mexilhão ($0,10 \pm 0,02$ mg/kg) e lambujinha ($0,05 \pm 0,01$ mg/kg). Assim, constata-se que a depuração não parece ser eficiente para reduzir os teores de Cd nestas três espécies bivalves, talvez fosse necessário prolongar o tempo de depuração para verificar oscilações nestes teores.

Resultados similares foram encontrados por Freitas *et al.* (2012), em que uma depuração de dois a sete dias efectuada nas espécies amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) e amêijoia-japonesa da ria de Aveiro não revelou diferenças assinaláveis nos teores de Cd.

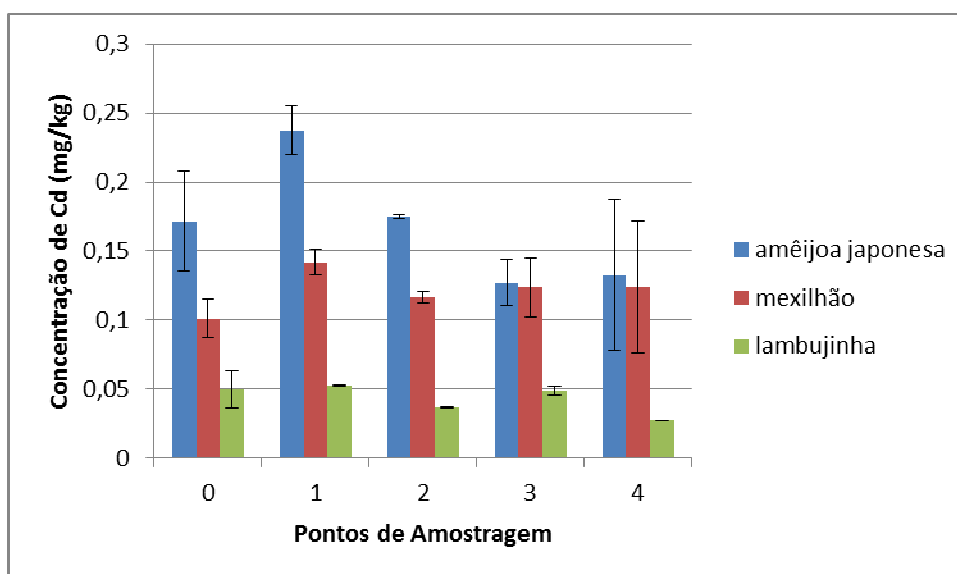


Figura 27: Teores médios de cádmio \pm desvio-padrão (mg/kg) nas três espécies, ao longo do tempo de depuração.

Relativamente ao Hg, o valor máximo legislado para os bivalves é 0,5 mg/kg. Neste estudo nenhuma das espécies registou teores acima deste limite (Figura 28). Pelo contrário, os teores de Hg foram muito baixos, com a amêijoia-japonesa a evidenciar os valores mais elevados de Hg ($0,07 \pm 0,00$ mg/kg), seguido da lambujinha ($0,04 \pm$

0,01 mg/kg) e o mexilhão ($0,027 \pm 0,002$ mg/kg). Ao longo da depuração não foram registadas variações significativas ($p > 0,05$) na concentração de Hg para as três espécies estudadas. Assim, constata-se que a depuração não parece ser eficiente para reduzir os teores de Hg nas três espécies de bivalves.

Freitas *et al.* (2012) reportou a redução dos teores de Hg após uma depuração de dois a sete dias efectuada na amêijoia boa e na amêijoia-japonesa espécies provenientes da ria de Aveiro embora os teores iniciais fossem mais elevados.

Alguns estudos na espécie amêijoia-asiática (*Corbicula flumínea*) reportam que ao fim de 30 dias de depuração não foi possível registar decréscimos nos teores de Cd e Hg. Só ao fim de 120 dias os decréscimo no teor de Cd e Hg foi na ordem de 25 % e 40 % (Inza *et al.*, 2008).

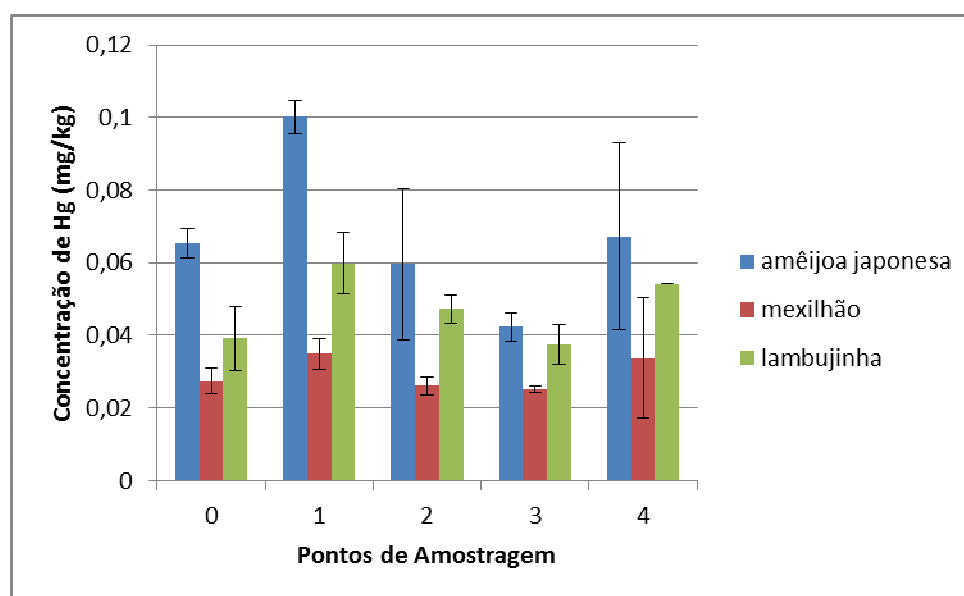


Figura 28: Teores médios de mercúrio \pm desvio-padrão (mg/kg) nas três espécies, ao longo do tempo de depuração.

De modo a demonstrar a eficácia da depuração proposta calculou-se a ingestão semanal tolerável (*Provisional Tolerable Weekly Intake* – PTWI) dos bivalves estudados antes e após a depuração (Tabela 9).

Relativamente ao Pb antes da depuração constatou-se que um adulto de 60kg podia consumir apenas 92 g de ingestão máxima semanal para amêijoia-japonesa (6 indivíduos), 82 g de mexilhão (9 indivíduos) e 15 g de lambujinha (2 indivíduos).

No entanto depois da depuração seria possível, consumir mais 199 g de amêijoia-japonesa (mais 8 indivíduos) e 24 g de lambujinha (mais 4 indivíduos). Embora se tenha observado no fim do tratamento a possibilidade de consumir mais 14 g (1 indivíduo) de mexilhão, o modelo estatístico utilizado não atribuiu esta variação ao tempo de depuração.

O Pb é o contaminante com maior risco de causar problemas crónicos a quem consuma a lambujinha do estuário do Tejo, mesmo após uma depuração de 16 dias.

Em relação ao Cd, na situação inicial verificou-se ser possível consumir apenas 41 g de amêijoia-japonesa (3 indivíduos) numa semana.

No caso do mexilhão a ingestão semanal sem risco seria de 69 g (7 indivíduos) e na lambujinha 141 g (21 indivíduos). O modelo estatístico utilizado não demonstrou que os valores diferentes de PTWI observados depois da depuração estejam relacionados com o tempo em que esta decorreu.

Verificou-se assim que o Cd é o metal com maior risco de causar problemas crónicos a quem consuma mexilhões ou amêijoas japonesas do estuário do Tejo. Esta situação comprovou-se durante todas as amostras destas duas espécies ao longo do tempo de depuração.

O teor Hg na lambujinha limita o seu consumo a 102 g semanais (15 indivíduos). Na amêijoia-japonesa este contaminante permite que se consumam apenas 61 g (4 indivíduos) e no mexilhão 146 g (15 indivíduos). Embora se tenham obtido valores diferentes de PTWI para o final da depuração, estes não se deverão ao tempo decorrido segundo o modelo estatístico utilizado.

Tabela 9: Quantidades máximas de bivalves que podem ser consumidas semanalmente por metal pesado, considerando um adulto de 60 Kg.

	mg/kg	Amêijoia-japonesa (g)		Mexilhão (g)		Lambujinha (g)	
	PTWI	SD	DD	SD	DD	SD	DD
Pb	0,025	92	291	82	96	15	39
Cd	0,007	41	53	69	56	141	255
Hg	0,004	61	60	146	118	102	74

SD – sem depuração; DD- depois da depuração

4.4. Teor de macro e micro elementos

Os bivalves são considerados uma fonte nutricional muito importante de elementos macro e micro essenciais. Neste estudo pretendeu-se avaliar o teor inicial dos diferentes elementos nas diferentes espécies de bivalves e avaliar o efeito da depuração na capacidade dos organismos conseguirem manter os teores inalterados dos elementos

Neste estudo, para se inferir sobre a qualidade nutricional dos bivalves utilizaram-se como referência os valores da RDA (*Recommended Daily Allowances*) definidos pelo Instituto de Medicina dos Estados Unidos da América. Estes são baseados na quantidade dos nutrientes necessários para prevenção de deficiências nutricionais e utilizados como padrão nos rótulos de alimentos.

Em tabelas são apresentados os valores dos minerais para os quais não se provou o efeito da depuração. Nos gráficos apresentam-se aqueles em que se verificou esse efeito para pelo menos uma espécie.

O Ca (cálcio) demonstrou ser o único mineral para qual as espécies em estudo não demonstraram teores significativamente diferentes ($p > 0,05$). Já os teores relativos ao Zn (zinco), Br (bromo) e Rb (rubídio) foram significativamente diferentes entre as três espécies ($p < 0,05$).

Nos teores de Cl (cloro), K (potássio) e Cu (cobre) o mexilhão demonstrou ser significativamente diferente ($p < 0,05$) das outras duas espécies.

Apresentando maiores teores de Cl e menores de Cu e K que as outras. Entre a amêijoia-japonesa e lambujinha não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nestes minerais.

Já para o S (enxofre), o Fe (ferro) e Sr (estrôncio) a lambujinha mostrou ser significativamente distinta ($p < 0,05$) das outras duas espécies, cujas amostras não variaram de forma significativa entre si ($p > 0,05$).

Na lambujinha e no mexilhão os teores de As (arsénio) e Se (selénio) não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre si. Nestes minerais a amêijoia-japonesa demonstrou ser significativamente distinta ($p < 0,05$) das duas outras espécies.

No mexilhão apenas se observaram oscilações significativas ($p < 0,05$) nos teores de três minerais: Fe, Br e Sr. Para os restantes minerais a amostra não revelou efeitos ao longo do tempo ($p < 0,05$). Os teores medidos ao longo do tempo para todos os minerais podem ser vistos na seguinte Tabela 10.

No início do estudo 100 g de mexilhão proporcionava as seguintes percentagens de ingestão diária recomendada (*Recommended Daily Allowances* – RDA, ver valores no Anexo 7): 44 % de Cl, 3 % de K, 4% de Ca, 47% de Fe, 16 % de Cu, 31 % Zn e 81 % de Se. Na sua fase inicial este alimento era então uma boa fonte de Fe, Zn e Se, embora a quantidade de Cl em 100g estivesse um pouco elevada, atingindo 28% do limite superior recomendando deste nutriente (*Tolerable Upper Intake Level*) – UL, ver valores no Anexo 8).

Tabela 10: Teores médios de minerais em mg/100g de mexilhão em peso húmido e respectivos desvios padrão.

	07-Mar	11-Mar	15-Mar	19-Mar	23-Mar
S	247,25 ± 18,15	362,09 ± 42,56	284,43 ± 10,69	261,46 ± 29,29	323,91 ± 166,14
K	144,95 ± 15,71	196,48 ± 5,40	147,59 ± 6,92	132,49 ± 24,38	153,22 ± 85,38
Ca	42,64 ± 2,96	52,29 ± 10,09	40,59 ± 6,12	30,70 ± 8,08	38,13 ± 5,82
Cu	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,06
Zn	3,42 ± 0,17	5,67 ± 0,07	4,98 ± 1,17	4,64 ± 0,34	4,73 ± 0,91
As	0,42 ± 0,03	0,54 ± 0,05	0,39 ± 0,03	0,37 ± 0,00	0,43 ± 0,16
Se	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,02

Na lambujinha 100g da parte edível contribuía, após serem capturadas, com as seguintes percentagens da RDA: 23 % de Cl, 5 % de K, 7% de Ca, 378 % de Fe, 38 % de Cobre, 110 % de Zn e 68 % de Se. Assim este produto mostrou ser, inicialmente muito rico em Zn e Se e rico em Cu (Tabela 11). No entanto, o teor de Fe estava demasiado elevado, encontrando-se 51 pontos percentuais acima do UL (Upper limit UL).

Esta situação alterou-se ao longo do tempo, dado que se notaram efeitos do tempo de depuração sobre o Fe ($p < 0,05$). Outros minerais onde se notaram alterações significativas ($p < 0,05$) foram: o Cl, o Fe, o Br e o Rb.

Tabela 11: Teores médios de minerais em mg/100g de lambujinha em peso húmido e respectivos desvios padrão.

	07-Mar	11-Mar	15-Mar	19-Mar	23-Mar
S	175,54 ± 11,32	224,49 ± 23,71	172,04 ± 13,97	177,70 ± 53,64	174,13 ± 3,97
K	217,22 ± 30,10	284,52 ± 31,61	222,27 ± 8,53	197,88 ± 41,06	186,37 ± 2,06
Ca	66,52 ± 3,47	80,53 ± 10,16	59,48 ± 13,97	83,65 ± 9,11	69,66 ± 1,09
Cu	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,22 ± 0,14	0,33 ± 0,00
Zn	12,12 ± 0,77	20,28 ± 2,99	14,06 ± 0,07	13,61 ± 5,54	19,72 ± 0,00
As	0,36 ± 0,02	0,47 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,07	0,37 ± 0,02
Se	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00

Em 100g de amêijoia-japonesa os teores dos principais minerais interessantes para a alimentação humana proporcionaram as seguintes percentagens de RDA: 29% de Cl, 4% de K, 5 % de Ca, 104 % de Fe, 35 % de Cu, 14 % de Zn e 288 % de Se. Assim, este alimento demonstra ser rico em Fe, Cu, Cl e Se (Tabela 12). No entanto os teores de Se e Fe encontram-se demasiado elevados, atingindo 40 % e 41 %, respectivamente, do limite superior recomendado (UL) (Anexo 8).

O tempo de depuração teve efeitos significativos ($p < 0,05$) na maioria dos minerais apenas se registaram alterações nos seguintes minerais: Fe, Br e Rb.

Tabela 12: Teores médios de minerais em mg/100g de amêijoia e respectivos desvios padrão.

	07-Mar	11-Mar	15-Mar	19-Mar	23-Mar
S	285,20 ± 18,43	344,72 ± 45,91	336,20 ± 15,61	301,65 ± 49,64	335,65 ± 7,87
K	184,81 ± 12,93	214,28 ± 8,50	203,98 ± 10,97	202,06 ± 1,87	192,27 ± 14,92
Ca	52,99 ± 8,32	45,09 ± 9,54	59,55 ± 24,56	76,78 ± 15,73	302,20 ± 32,54
Cu	0,32 ± 0,05	0,34 ± 0,10	0,21 ± 0,04	0,19 ± 0,00	0,21 ± 0,02
Zn	1,53 ± 0,15	1,73 ± 0,26	1,58 ± 0,19	1,53 ± 0,12	1,59 ± 0,05
As	0,75 ± 0,10	0,81 ± 0,08	0,58 ± 0,05	0,58 ± 0,02	0,58 ± 0,13
Se	0,60 ± 0,02	0,23 ± 0,07	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,03

No mexilhão o teor de Fe diminuiu significativamente ($p < 0,05$) logo nos primeiros quatros dias para metade do valor inicial, passando 100g de mexilhão a contribuir com apenas 23 % do RDA. Nos restantes dias este valor não se alterou de forma significativa ($p < 0,05$) (Figura 29).

Na lambujinha este teor desceu significativamente ($p < 0,05$) após 12 dias de depuração, para menos de metade do valor inicial. Após esse ponto de amostragem não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Este decréscimo diminuiu o risco de ingestão de lambujinha, visto que o teor de Fe se encontrava muito acima do recomendado. Mesmo com esta descida, o Fe encontrou-se num teor elevado, 100 g contribuindo com 147 % do RDA e atingindo os 59 % do UL.

O teor de Fe na amêijoia-japonesa decresceu significativamente ($p < 0,05$) nos primeiros quatro dias, para menos de metade do valor inicial. Nos dias restantes não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Com esta diminuição 100 g de amêijoia-japonesa passaram a contribuir com 35 % do RDA. Desta forma o risco de consumir este bivalve também diminuiu, dado o elevado teor inicial.

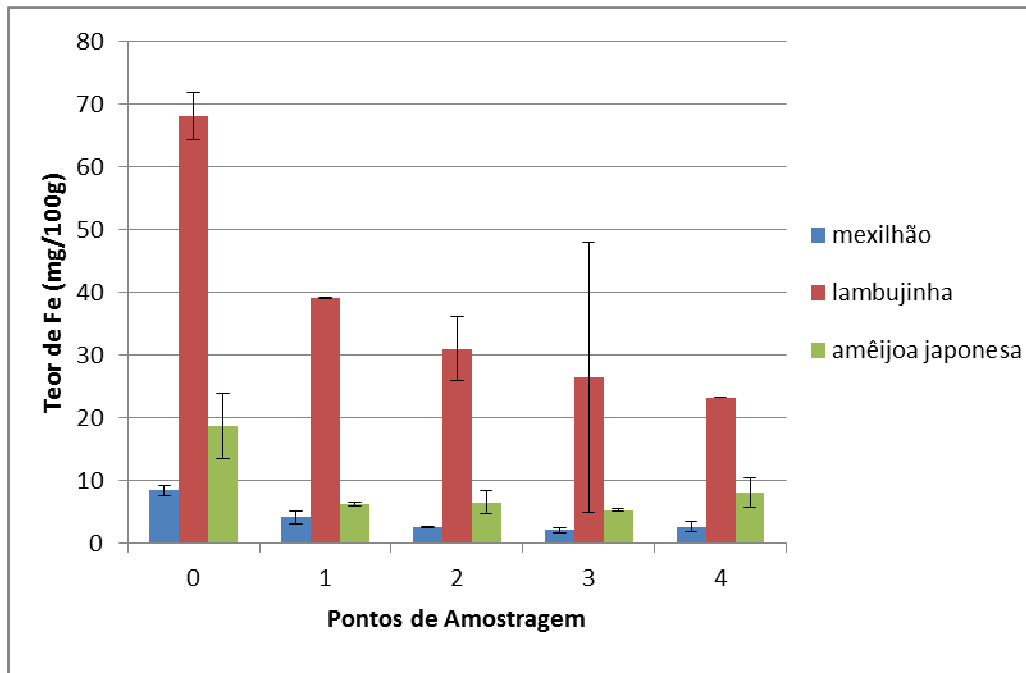


Figura 29: Teor de Fe nas três espécies.

O teor de Br no mexilhão decresceu longo do tempo (Figura 30). Observou-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) deste mineral após oito dias, mantendo-se em teores próximos das 6,5 mg/100g até ao final da depuração.

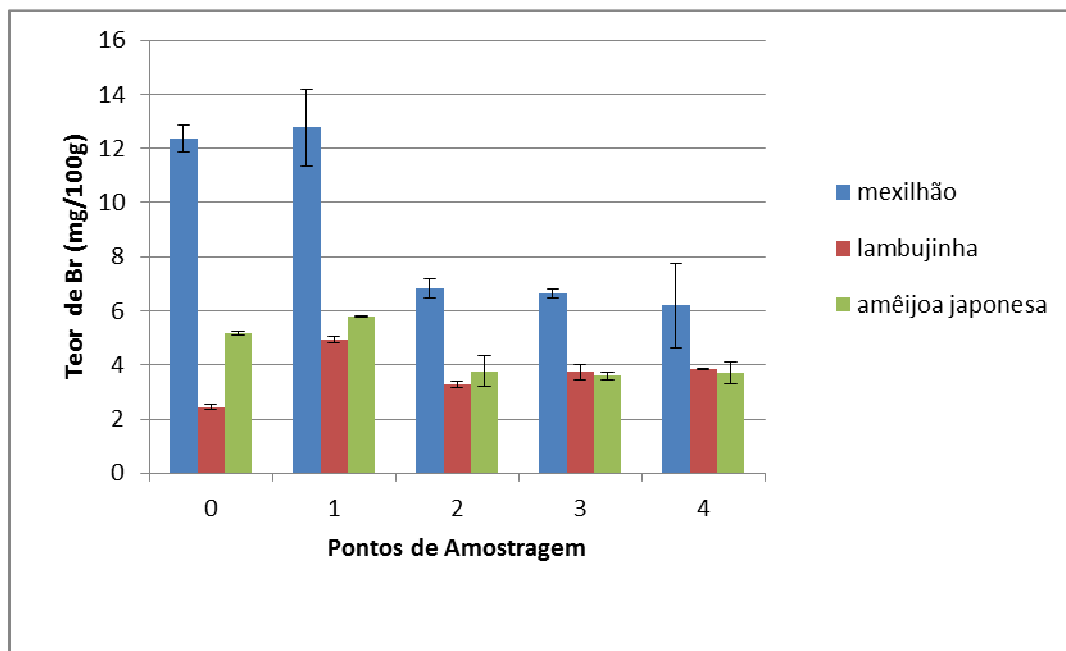


Figura 30: Teor de Br nas três espécies.

Na lambujinha o teor deste mineral aumentou significativamente ($p < 0,05$) nos primeiros quatro dias de depuração, atingindo um valor duas vezes maior. No entanto, este valor desceu significativamente ($p < 0,05$) para um valor acima do inicial nos quatro dias seguintes, não sofrendo depois mais oscilações significativas ($p > 0,05$) (Figura 31).

Este mineral teve um decréscimo significativo ($p < 0,05$) na amêijoia-japonesa após oito dias, mantendo-se sem oscilações significativas ($p > 0,05$) nos restantes dias de depuração.

No mexilhão o teor de Sr registou um decréscimo significativo ($p < 0,05$) após oito dias. Nos restantes dias este teor não se alterou significativamente ($p > 0,05$), não demonstrando também diferenças significativas em relação ao primeiro ponto de amostragem ($p < 0,05$) (Figura 31).

O teor do Sr na lambujinha sofreu um aumento significativo ($p < 0,05$) nos primeiro quatro dias de amostragem. Nos quatro dias seguintes desceu significativamente ($p < 0,05$), voltando a subir de 15 a 19 de Março, dia a partir do qual não variou significativamente ($p > 0,05$).

Na amêijoia-japonesa não foi possível detectar o efeito do tempo de depuração ($p > 0,05$) no teor do Sr.

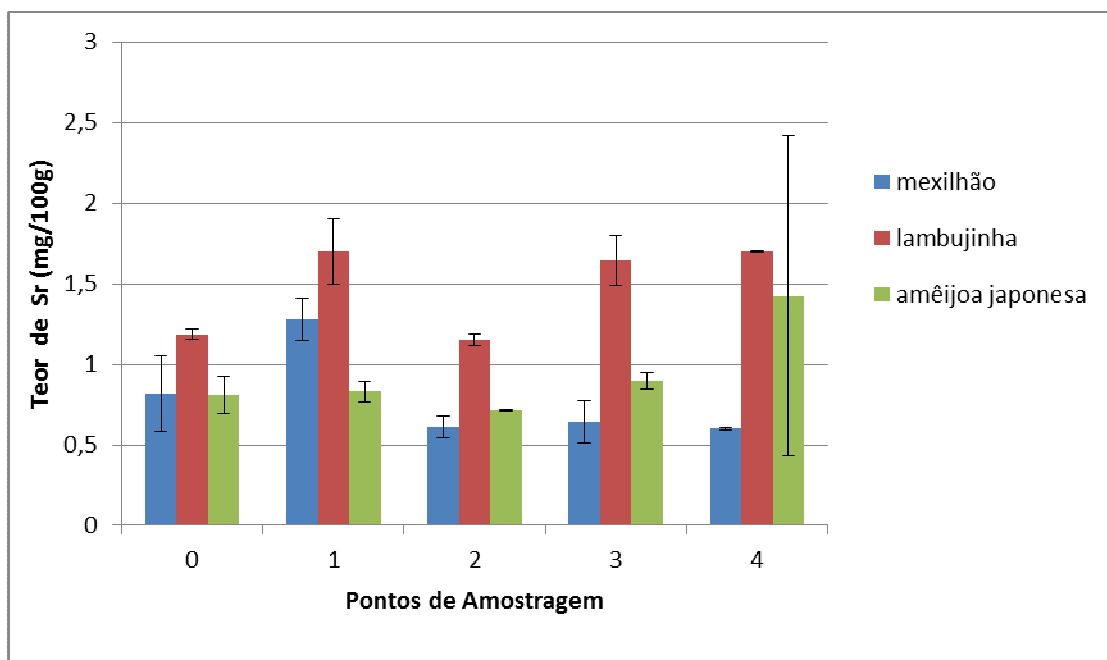


Figura 31: Teor de Sr nas três espécies.

No teor de Cl na lambujinha registou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nos primeiros quatro dias, descendo depois significativamente ($p < 0,05$) nos restantes dias (Figura 32).

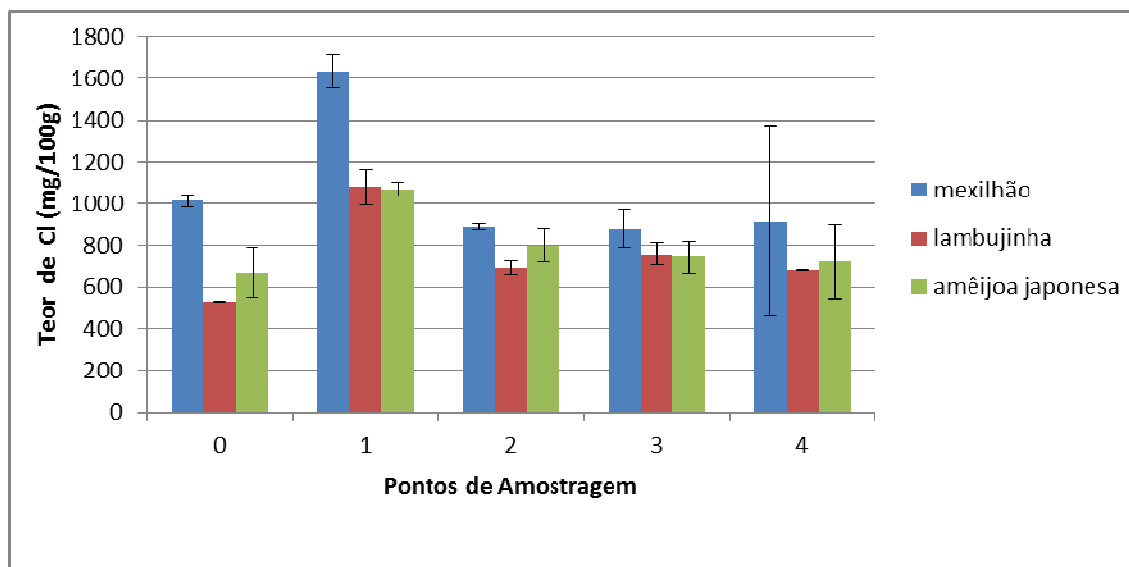


Figura 32: Teor de Cl nas três espécies.

Embora o efeito do tempo de depuração sobre o teor de Cl no mexilhão não tenha sido significativo ($p > 0,05$), deve referir-se que para um nível de significância menos rígido ($\alpha = 0,1$) se nota algum efeito ($p < 0,1$). Ocorre uma diferença significativa ($p < 0,1$) do segundo ponto de amostragem para os restantes. Nestes outros dias este teor não revela diferenças significativas ($p > 0,1$) do primeiro dia.

Na amêijoia-japonesa também só se observam efeitos relevantes com uma significância de $\alpha = 0,1$. Nestas amostras notou-se um aumento significativo ($p < 0,1$) nos primeiros quatro dias, seguindo-se de um decréscimo significativo ($p < 0,1$) para os restantes dias, onde se verificaram teores não significativamente diferentes ($p > 0,1$) do primeiro dia.

Observou-se assim o mesmo tipo de comportamento para as três espécies, embora com menor confiança estatística (90 %) no caso da amêijoia-japonesa e do mexilhão.

Na lambujinha o teor de Rb diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para menos de metade logo nos primeiros quatro dias, após os quais não sofreu oscilações significativas ($p > 0,05$) (Figura 33).

Este teor também desceu significativamente ($p < 0,05$) na amêijoia-japonesa após quatro dias, para menos de metade do valor inicial. Durante o resto da depuração não se notaram alterações significativas deste mineral ($p > 0,05$).

No mexilhão não foi possível observar qualquer efeito do tempo de depuração ($p > 0,05$) sobre o teor de Rb.

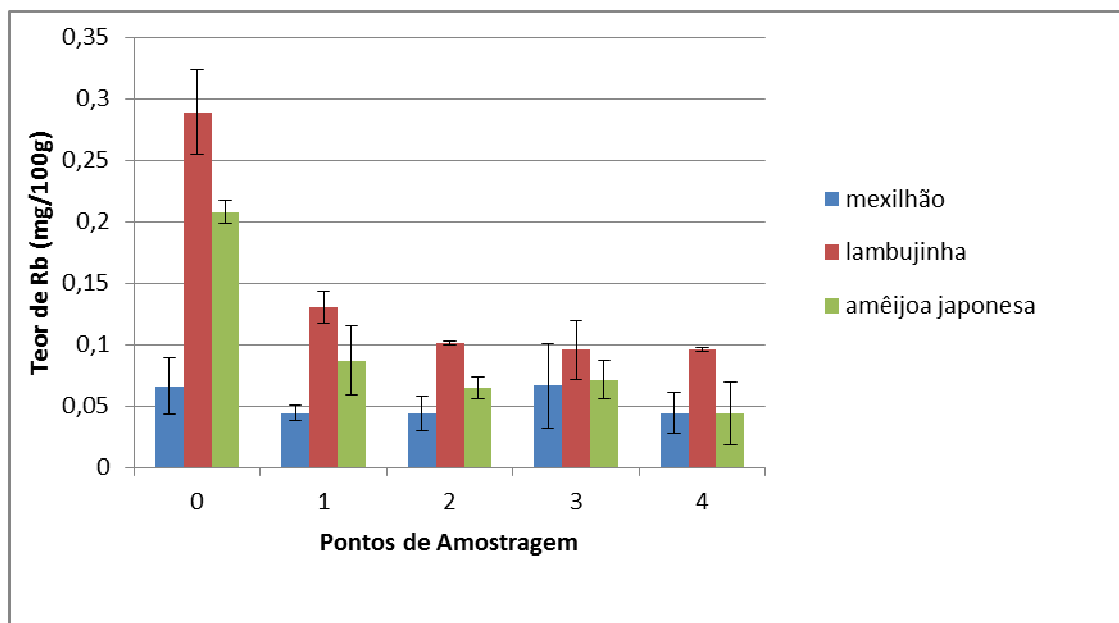


Figura 33: Teor de Rb nas três espécies.

Em suma ao longo da depuração a maioria dos minerais não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) e a variabilidade de resultados obtidos em cada espécie e elemento, não permite traçar um padrão geral que relacione a concentração dos minerais face à depuração. A exceção mais importante em termos nutritivos foi o Fe este mineral diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) logo nos primeiros quatro a oito dias.

O Rb também demonstrou um decréscimo significativo ($p < 0,05$) após quatro a oito dias mas só na amêijoia e lambujinha.

As outras exceções ocorreram no Sr e Br notaram-se evoluções dos teores distintas em cada espécie. O Sr não variou significativamente da amêijoia ($p < 0,05$)

Durante o tratamento não se verificaram oscilações significativas nos teores dos restantes minerais das três espécies.

Os bivalves são considerados uma boa fonte nutricional de minerais essenciais normalmente acumulam nos seus tecidos os elementos macro e micro de acordo com a sua dieta (Orban *et al.*, 2006).

Existem flutuações na composição mineral de acordo com mudanças na disponibilidade de alimento e ciclo reprodutor e o habitat onde se encontram (Orban *et al.*, 2006).

Alguns estudos indicam ainda dificuldades em quantificar o teor de minerais devido a presença de areias no interior da valvas dos bivalves o que pode ser um factor de variabilidade mineral nas amostras (Orban *et al.*, 2006).

5. Conclusão

Neste estudo todos os animais foram sujeitos a uma transição do seu habitat natural para um ambiente artificial, i.e. os tanques de depuração. Esta transição não teve os mesmos efeitos nas três espécies estudadas.

A mortalidade ao longo do tratamento foi nula, e quase nula, respectivamente na amêijoja-japonesa e no mexilhão. No entanto para a lambujinha observou-se uma taxa de mortalidade de 11 % no final da depuração.

Neste último bivalve observou-se também o maior decréscimo de glicogénio no músculo adutor, passando de $19,36 \pm 0,98$ mg/100g no início do estudo para $9,5 \pm 0,3$ mg/100g no final. Assim se pôde concluir que a lambujinha foi a espécie com maior stress fisiológico ao longo da depuração.

No mexilhão também se observou um decréscimo neste teor, que no início do estudo era $5,03 \pm 0,18$ mg/100g, passando para $2,7 \pm 0,4$ mg/100g no final. Na amêijoja-japonesa não se observou efeito do tempo de depuração no teor de glicogénio, podendo assumir-se assim a sua melhor condição e resistência relativamente às outras espécies, bem como, uma melhor capacidade de adaptação às condições da depuração.

Dos contaminantes estudados, a depuração revelou-se particularmente eficaz nos resultados para o Pb nas três espécies. A presença deste metal pesado revelou-se importante sobretudo no caso da lambujinha, que inicialmente apresentava um valor fora do limite permitido, tendo este descido para $0,64 \pm 0,3$ mg/kg, ainda assim o Pb continuou a ser um contaminante de risco na lambujinha, sendo possível consumir apenas 6 indivíduos desta espécie sem esperar riscos de doenças crónicas.

Este estudo permitiu concluir que a depuração constitui uma solução eficaz na redução dos teores de Pb em bivalves

Nas outras espécies o teor de Pb também decresceu, mas foi o teor de Cd, que limita o consumo de bivalves. No caso do mexilhão apenas será possível consumir 7 indivíduos e 3 de amêijoja-japonesa sem riscos de implicações crónicas e 21 de lambujinha.

Sendo a amêijoa-japonesa uma espécie com grande valor comercial que habita em grande número no estuário do Tejo, deverá então realizar-se uma depuração com um período mais alargado para se poder inferir sobre os teores de Cd.

Os teores de Hg não foram limitativos do consumo, mas mesmo assim constituem uma fonte de risco nas amostras estudadas.

Embora não seja um metal contaminante, observaram-se teores pouco desejáveis de Fe na lambujinha e na amêijoa-japonesa. Na primeira fase este teor estava acima o limite tolerável (UL), no fim da depuração encontrava-se a 41 % deste limite.

A depuração revelou também ser útil para diminuir os teores mais elevados de Fe, resolvendo a situação no caso da amêijoa-japonesa mas não sendo suficiente no caso da lambujinha que se encontrou no fim do estudo com perto de 59 % do limite superior aceitável.

Nos outros minerais não se notaram oscilações relevantes, a não ser no caso do Sr, do Br, do Cl e do Rb que desceram de forma diferentes nas três espécies estudada.

Assim a depuração, no tempo em que decorreu, diminui o teor de Pb e Fe nas três espécies. Considerando a baixa taxa de mortalidade, a boa condição animal e os teores de glicogénio durante o trabalho experimental, pôde-se concluir que a amêijoa-japonesa constituiu a espécie que melhor se adaptou às condições de depuração utilizadas neste estudo.

6. Referências Bibliográficas

- Ackman, R.G, 1995. Composition and Nutritive Value of Fish and shellfish Lipids. *Fish and Fishery Products*, 5^a ed. 117–156
- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Pérez-Camacho, A., 2007. Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: physiological and biochemical parameters. Comparative biochemistry and physiology. *Part B, Biochemistry & molecular biology*, 146(2) 241–9.
- Araki, S., 2000. Subclinical Neurophysiological Effects of Lead: A Review on Peripheral, Central, and Autonomic Nervous System Effects in Lead Workers. *American Journal of Industrial Medicine*, 37 (2):193
- Bandarra, N.M., Calhau, M.A.; Oliveira, L.; Ramos, M.; Dias, M.G., Bártolo, H.; Faria, M.R; Fonseca, M.C., Gonçalves, J., Batista, I., Nunes, M.L. 2004. *Publicações Avulsas do IPIMAR*, 103
- Beltrán-Lugo, A.I., Maeda- Martínez 2006 A, N., Pacheco-Aguilar, R., Héctor, Nolasco-Soria, G., Seasonal variations in chemical, physical, textural, and microstructural properties of adductor muscles of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*). *Aquaculture*, 258 (1-4):619–632
- Brayn, G.W., Uysal, H., 1978. Heavy metals in the burrowing bivalves *scrobicularia plana* from the tamar estuary relation to environmental levels. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*
- Bryan, G.W., Langston, W.J. Hummertone, L.G., 1980. The use of biological indicators of heavy metal contamination in estuaries: with special reference to an assessment of biological availability of metals in estuarine sediments from south-west Britain. *Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1–73
- Cabral, H.N., Costa, M.J., Salgado, J.P., 1999. Differential use of nursery areas within the Tagus estuary by sympatric soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Environmental Biology of Fishes*, 56,: 389-397
- Cachola, R. ; Silva, H.A., 2008. Depuração dos Molusco Bivalves. *Publicações Avulsas do IPIMAR - Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*. Lisboa, 112–126
- Calabuig, J.A.G, Medicina Legal y Toxicologia, 6^a ed, Masson, Barcelona, 2004
- Canário, J., Vale, C., Poissant, L., Nogueira, M., Pilote, M., Branco, V., Mercury in sediments and vegetation in a moderately contaminated salt marsh (Tagus Estuary, Portugal). *Journal of Environmental Sciences*, 22(8), 1151–1157.

- Carvalho, C.E.V. ; Cavalgande, M.P.O.; Gomes,M.P.; Faria, V.V., Rezende, C.E. 2001. Distribuição de Metais Pesados em Mexilhões (*Perna perna*, L.) da Ilha de Santa-na Macaé, SE, Brasil. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 4
- Carvalho, M.L., Pereira, R.A., Brito, J., 2002. Heavy metals in soft tissues of *Tursiops truncatus* and *Delphinus delphis* from west Atlantic Ocean by X-ray spectrometry. *The Science of the Total Environment*, 292: 247-2
- Cavaco, H., Nogueira, M.,Oliveira, Franco., V., Cabeçadas, 2006. Melhoria das Condições Ambientais do Estuário do Tejo e zona Costeira Adjacente. *IPIMAR Divulgação*.
- Chapman, L.; Chan, H.M., 2000. The influence of nutrition on methyl mercury intoxication. *Environmental health perspectives*, (108) 29–56
- Clarkson, W.T., Vyas, J.B. Ballatori, N., Mechanisms of Mercury Disposition in the Body. *American Journal of Industrial Medicine*, 50:757-764
- Coimbra, J., Carraça, S., 1990. Accumulation of Fe, Zn, Cu and Cd during the different stages of the reproductive cycle in *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95 (c), 2, 265–270
- Costa, V., Lourenço, H.M. Figueiro, I., Carvalho, L., H., Farias, I., Pires, L. Afonso, C., Vieira, A.R., Nunes, M.L. Gordo, L.S., 2009. Mercury, cadmium and lead in black scabbardfish (*Aphanopus carbo* Lowe, 1839) from mainland Portugal and the Azores and Madeira archipelagos. *Scientia Marina*, 73S2,77–88
- DGPA, 2006. Recursos da pesca, Série Estatística 2005. Direcção Geral das Pescas e Aquicultura Marinha em Portugal, Lisboa, 19 A–B, 185
- EPA, 1997. Mercury Study Report to Congress: Fate and Transport of Mercury in the Environment,III.
- EPA, 1998. Test Method 7473: Mercury in solid and solutions by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry. *Environment Protection Agency*, 14
- FAO, 2011a. Cultured Aquatic Species Information Program. *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). Fisheries and Aquaculture Department, Food and agriculture Organization.
- FAO, 2012. Fishery Commodities Production and Trade.
- FAO, 2011b. *Fishery and Aquaculture Statistics*
- FAO, 2010. *The State of World Fisheries and Aquaculture*

- FDA, 1993. Guidance for lead in shellfish. ,Washington, 29
- Fernandes, L., 2008. O Circuito de Comercialização dos Moluscos Bivalves da Produção ao consumidor final. *Publicações Avulsas do IPIMAR - Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*. Lisboa, 120–132
- Ferreira, J.G., Simas, A. Nobre, M.C. Silva, K. Shifferegger, J. Lencart-Silva. 2003. Identification of sensitive areas and vulnerable zones in transitional and coastal portuguese systems. Application of the United States National Estuarine Eutrophication Assessment to the Minho, Lima, Douro, Ria de Aveiro, Mondego; Tagus, Sado Mira, Ria F. *Instituto da Água-INAG / Instituto do Mar-IMAR Lisbon, Portugal*, 151
- França, S., Vinagre. C., Caçador , I., Cabral, H.N., 2005. Heavy metal concentrations in sediment , benthic invertebrates and fish in three salt marsh areas subjected to different pollution loads in the Tagus Estuary, *Marine Pollution Bulletin*, 50: 998–1003
- Galvão, P.M.A. Rebelo, M.F., Torres, J.P.M., Guimarães, O.M. 2009. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: Aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. *Brazilian Journal Aquatic Science and Technology*, 13 (2): 59-6
- Gameiro, C. Cartazana, P. Cabrita M. Variability in chlorophyll and phytoplankton composition in an estuarine system. *Hydrobiologia*, 525: 113–124
- Gaspar, M.B., 2010. Distribuição, abundância e estrutura demográfica da amêijoia-japonesa (*Ruditapes philippinarum*) no Rio Tejo. *Relatório IPIMAR*.
- Greenstein, B. Greenstein, A., 2000. *Color Atlas of Neuroscience Neuroanatomy and Neurophysiology* New York: Suttgart, Thieme.
- Guerreiro, J., 1991. Ecologia, dinâmica e produção de *Scrobicularia plana* (Da Costa, 1778) (Mollusca, bivalvia) nos estuários dos rios Mira e Tejo (Portugal). Tese de Doutoramento, 289
- Holland, D.A. Chew, K.K., 1974. Reproductive cycle of the Manila clam (*Venerupis japonica*) from Hood Canal, Washington. *National Shellfisheries Association*, 64: 53–58
- Hughes, R.N., 1969. A study of feeding in *Scrobicularia plana*. *Journal of Marine Biology Assessment, United Kingdom*, 49
- Hughes, R.N., 1970. An energy budget for a tidal flat population of the bivalve *Scrobicularia plana* (Da Costa). *Journal of Animal Ecology*, 39: 357 – 381

- Huss, H.H., Reilly, A., Karim Ben Embarek, P., 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, 11(2):149–156
- Inza, B., Ribeyre, F., Boudou, A., 1998 Dynamics of cadmium and mercury compounds (inorganic mercury or methylmercury): uptake and depuration in *Corbicula fluminea*. Effects of temperature and pH. *Aquatic Toxicology*, (43): 273–285
- Jan, A. T., Murtaza, I., Ali, Mohd. Q., 2009. Mercury pollution: an emerging problem and potential bacterial remediation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25 (9), 1529–1537
- Jorhem, L., 2000. Determination of metals in food by atomic absorption spectrometry after dry ashing: NMKL Collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*.
- Kandel, E.R., Siegelbaum, A.S., 2001. Overview of Synaptic Transsion. *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-Hill.
- Khalil, N., Morrow, L.A., Needleman, H., Talbott, E.O., Wilson, J.W. Cauley, J.A., 2009. Association of Cumulative Lead and Neurocognitive Function in and Occupational Cohort. *Neuropsychology*, 37
- Klaassen, C.D. & Watkins III, J.B., 2001a. Aplicações da Toxicologia. *A Ciência Básica dos Tóxicos de Casarett e Doull*’s. Indiana: McGraw-Hill, 519– 837
- Laks, D., 2009. Luteinizing hormone provides a causal mechanism for mercury associated disease. *Medical Hypotheses*.
- Lee, B.G., Lee, J.S., Luoma, S.N., Choi, H.J., Koh, C.H., 2000. Influence of acid-volatile sulfide and metal concentrations on metal bioavailability to marine invertebrates in contaminated sediments, *Environmental Science and Technology*, 34, 4517–4523
- Lee, R; Lovatti, A., Ababouch, L. 2008 Bivalve depuration: Fundamental and practical aspects. *FAO Fisheries Technical Paper*. N° 511 Rome, FAO. 139
- Lee, S., 1996. Distribution pattern and interaction of two infaunal bivalves, *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) and *Anomalocardia squamosa* (Linnaeus) (Bivalvia: Veneridae). *Experimental Marine Biology Ecology*, 253–273
- Livingstone, D.R., Bayne, B.L., 1977, Comparative Responses of *Mytilus edulis* to Low Oxygen Tension: Anaerobic Metabolism of the Posterior Adductor Muscle and Mantle Tissues, *Journal of Comparative Physiology* 114B: 143-155
- Lubell, D., Jackes, M., 1994. The Mesolithic-Neolithic Transition in Portugal: Isotopic and Dental Evidence of Diet, *Journal of Archaeological Science*, 201–216

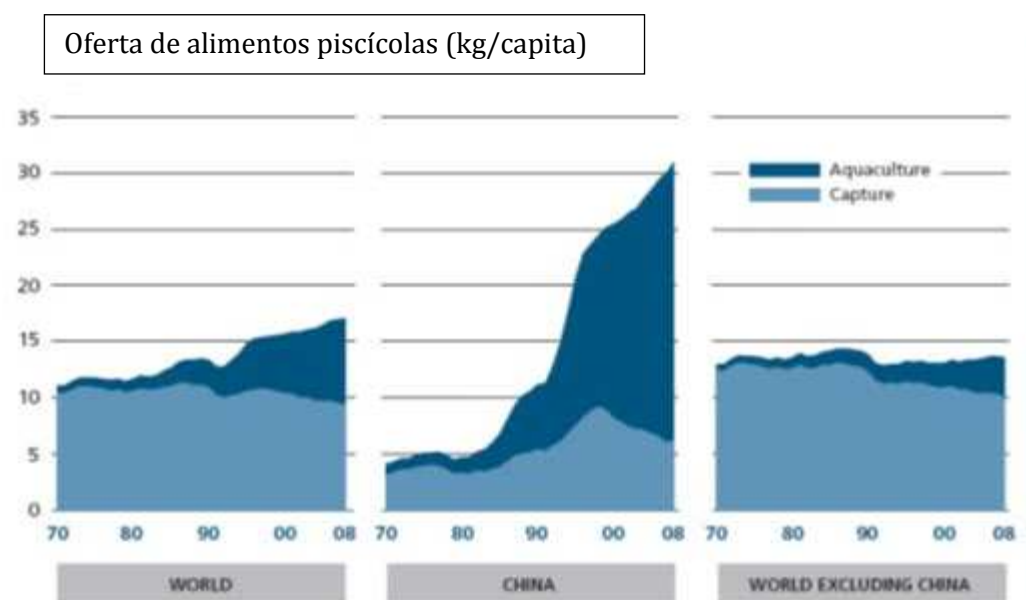
- Mann, R., 1979. The effect of temperature on growth, physiology and gametogenesis in the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 121–133, 38
- Melià, P., Gatto, M., 2005. A stochastic bioeconomic model for the management of clam farming. *Ecological Modelling*, (1): 163–174
- Miller, G.L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 1959. 31(3): 426-428
- Morel, F. M. M., 1998, The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury, Annual Review of *Ecology and Systematics*; Vol. 29 (1)
- Norma Europeia EN 14084, 2003. Determination of trace elements - Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion.
- Nunes, M. L., Batista, I., Bandarra, N.M., 2008. Produtos da Pesca: Valor Nutricional e Importância para a Saúde e Bem- Estar dos Consumidores. *Publicações Avulsas do IPIMAR*. Lisboa, 10–90
- Ohba, S., 1959. Ecological studies in the natural population of a clam, *Tapes japonica*, with special reference to seasonal variations in the size and structure of the population and to individual growth, *Biological Journal of Okayama University*, 5: 13–43.
- Orban, E., Lena, G.D., Navigato, T., Casini, I., Caproni, R., Santaroni, G., Giulini, G., 2006, Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea, *Food Chemistry* 101 1063–1070
- Peraza, M.A.Fierro-Ayala, F. Barber, D.S., Casarez, E., Rael, L.T., 1998. Effects of micronutrients on metal toxicity; *Environmental Health Perspectives Supplements*; *Environmental Health Perspectives Supplements*, 106, 203–216
- Phillips, D.J.H., 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in the marine and estuarine environments - a review. *Environmental Pollution*, 13, 281-217.
- Reeves, P.G., Chaney, R.L., 2008. Bioavailability as an Issue in Risk Assessment and Management of Food Cadmium: A review. *Science of the Total Environment*, 398, 13–19
- Renwranztz, L., Werner, I., 2007. Origin of a Metal-Binding Protein in Serum of *Mytilus edulis*. *Journal of Molluscan Studies* 2: 1-7.
- Risher, J.F. De Rosa, C.T., 2007. Inorganic: The Other Mercury. *Journal of Environmental Health*, 70 (4)

- Rodríguez-Moscoso, E., Pazo, J.P., García, A., Fernández-Cortés, F., 1992. Reproductive cycle of Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) in Ria of Vigo (NW Spain), 6
- Rowlan, I., Davies, M. Grasso, P., 1997. Biosynthesis of Methylmercury Compounds by the Intestinal Flora of the Rat. *Archives of Environmental Health*, 32 (1): 24-28
- Siegelbaum, A.S, Koester, J., 2001. Ion Channels. *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-Hill.
- Silbergeld, E.K., Waalkes, M., Rice, J.M., 2000. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *American journal of Industrial Medicine*, 38 (3), 316–23
- Silva, H.A., Costa, P. Rodrigues, S., 2008. Morfologia, Biologia e Ecologia dos Moluscos Bivalves. *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal Publicações Avulsas do IPIMAR*. Lisboa, 17–38
- Silva, P.D., Magalhães, A. Barracco, M., 2009. Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: *Bucephalidae*) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratones Grande Island, *Brazilian Journal of Invertebrate Pathology*, (79), 154–162
- Souto, H., 2001. A decadência da pesca nos estuários portugueses: o estuário do Tejo. *Teia*, (1967), 1–14
- Stankovic, S., Jovic, M., 2011. Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood. *Environmental Chemistry Letters*, 1-12
- Trigo, R. M., Pozo- Vázquez D., Osborn, T.J., Castro-Díez, Y., Gámi, Fortis, S., 2004, North Atlantic oscillation influence on precipitation, river flow and water resources in the Iberian Peninsula. *International Journal of Climatology*, 24: 925-944
- Vale, C., Canário, J. Caetano. M. Lavrado, Brito.P., 2008. Estimation of the anthropogenic fraction of elements in surface sediments of the Tagus Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 56 (7) 1364–7
- Viles, F.J., Silverman, L., 1949. Determination of starch and cellulose with anthrone. *Analytical Chemistry* 21 (8):950-953
- Vries, J., 1997. Food Safety and Toxicity. CRC Press, 30-40
- WHO, 2006. Exposure to Mercury: A major public health concern. *Preventing Disease Through Healthy Environments*, 4
- WHO, 2005. Policy Paper: Mercury in Health Care. Geneva, World Health Organization of the United Nations, (WHO/SDE/WSH/O5.08).

- Xie, Q., Burnell, G.M., 1994. A comparative study of the gametogenic cycles of the clams *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1840) and *Tapes decussatus* (Linnaeus) of the south coast of Ireland, *The Journal of Shellfish Research* 13 (2): 467–472

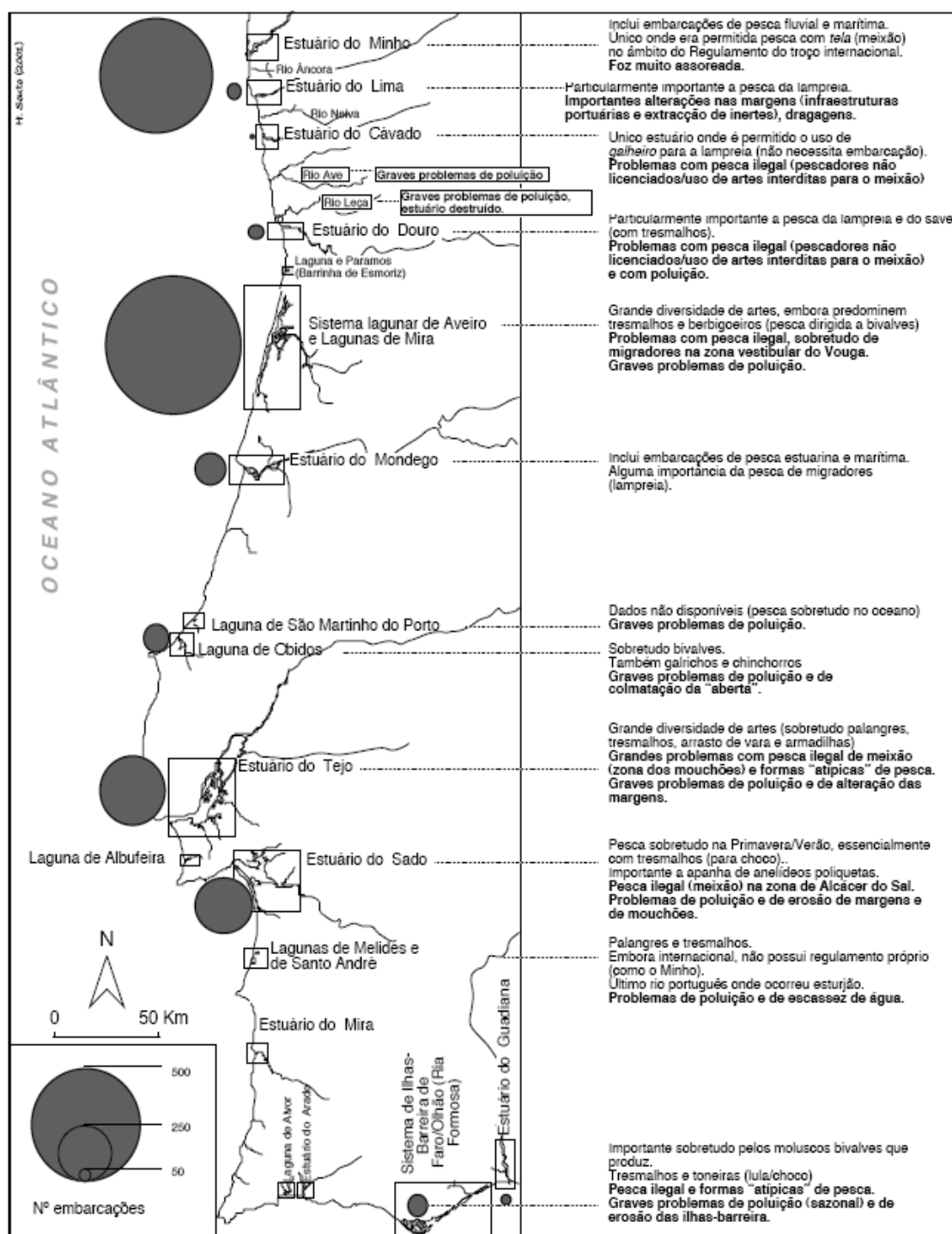
7. Anexos

Anexo 1. Aquacultura e captura de produtos piscícolas para consumo no mundo (FAO, 2011)



Anexo 2

Principais estuários e sistemas lagunares costeiros em Portugal continental, número de embarcações licenciadas (1999) e principais notas sobre as actividades de pesca e o seu estado de “conservação”(Souto, 2001).



Anexo 3 – Centros de depuração e expedição (Cachola *et al.*, 2008)

Regiões	Centros de depuração e expedição	Centros de expedição
Norte	2	0
Centro	3	0
Lisboa	9	2
Alentejo	0	0
Algarve	8*	1**

*1 Está com o número de aprovação suspenso; **Número de aprovação suspenso.

Anexo 4- Temperaturas limite recomendadas para depuração de algumas espécies
(Lee *et al.*, 2008)

Espécie	Nome Comum	Temperaturas (° C)		País
<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra-do-pacífico	8	18	Reino Unido
<i>Ostrea edulis</i>	Ostra plana	5	15	Reino Unido
<i>Mytilus edulis</i>	Mexilhão	5	15	Reino Unido
<i>Cerastoderma</i>	Berbigões	7	16	Reino Unido
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Amêijoia-mercenária	12	20	Reino Unido
<i>Tapes decussatus</i>	Amêijoia-boia	12	20	Reino Unido
<i>Tapes philippinarum</i>	Amêijoia-japonesa	5	20	Reino Unido
<i>Ensis spp.</i>	Lingueirão	10	-	Reino Unido

Anexo 5- Limites mínimos de salinidade (Lee *et al.*, 2008)

Espécie	Nome Comum	Mínimo Salinidade (‰)	País
<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra-do-pacífico	20,5	Reino Unido
<i>Ostrea edulis</i>	Ostra plana	25,0	Reino Unido
<i>Mytilus edulis</i>	Mexilhão	19,0	Reino Unido
<i>Cerastoderma</i>	Berbigões	20,0	Reino Unido
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Amêijoia-mercenária	20,5	Reino Unido
<i>Tapes decussatus</i>	Amêijoia-boia	20,5	Reino Unido
<i>Tapes philippinarum</i>	Amêijoia-japonesa	20,5	Reino Unido
<i>Ensis spp.</i>	Lingueirão	30	Reino Unido

Anexo 6- Vantagens e desvantagens associadas aos três agentes de esterilização da água usados nos sistemas de depuração de bivalves (Cachola & Silva, 2008).

Agente	Vantagens	Desvantagens
Radiações UV	<p>Ausência de produtos químicos tóxicos; Tempo de contacto instantâneos; Simplicidade de funcionamento e da tecnologia;</p> <p>Custos de funcionamento baixos; Não afecta o meio ambiente</p>	<p>Duração da vida das lâmpadas relativamente curta; Necessidade de controlo permanente da eficácia do sistema;</p> <p>Necessidade de baixa turbidez da água</p>
Ozono	<p>Oxigenação da água; Tempos de contacto muito curtos; Desaparecimento do ozono residual em 3 minutos; Fraca toxicidade para o homem; Fiabilidade do sistema inteiramente automatizado</p>	<p>Investimento inicial elevado; Custos de funcionamento e manutenção elevados; Oxidação dos iões brometo a bromatos; Riscos de branqueamento das conchas em caso de excesso de ozono; Manutenção do equipamento necessita de pessoal especializado em electrónica.</p>
Cloro	<p>Baixos custos de instalação e funcionamento</p>	<p>Formação de cloraminas estáveis que podem ser tóxicas; A água não deve ser rica em matéria orgânica; Libertação de vapores corrosivos que são perigosos; Necessidade de tempo de contacto longo em tanques independentes; Necessidade de eliminar o excesso de cloro</p>

Anexo 7

Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes, Elements
Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies

Life Stage Group	Calcium (mg/d)	Chromium (µg/d)	Copper (µg/d)	Fluoride (mg/d)	Iodine (µg/d)	Iron (mg/d)	Magnesium (mg/d)	Manganese (mg/d)	Molybdenum (µg/d)	Phosphorus (mg/d)	Selenium (µg/d)	Zinc (mg/d)	Potassium (g/d)	Sodium (g/d)	Chloride (g/d)
Infants															
0 to 6 mo	200*	0.2*	200*	0.01*	110*	0.27*	30*	0.003*	2*	100*	15*	2*	0.4*	0.12*	0.18*
6 to 12 mo	260*	5.5*	220*	0.5*	130*	11	75*	0.6*	3*	275*	20*	3	0.7*	0.37*	0.57*
Children															
1–3 y	700	11*	340	0.7*	90	7	80	1.2*	17	460	20	3	3.0*	1.0*	1.5*
4–8 y	1,000	15*	440	1*	90	10	130	1.5*	22	500	30	5	3.8*	1.2*	1.9*
Males															
9–13 y	1,300	25*	700	2*	120	8	240	1.9*	34	1,250	40	8	4.5*	1.5*	2.3*
14–18 y	1,300	35*	890	3*	150	11	410	2.2*	43	1,250	55	11	4.7*	1.5*	2.3*
19–30 y	1,000	35*	900	4*	150	8	400	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.5*	2.3*
31–50 y	1,000	35*	900	4*	150	8	420	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.5*	2.3*
51–70 y	1,000	30*	900	4*	150	8	420	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.3*	2.0*
> 70 y	1,200	30*	900	4*	150	8	420	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.2*	1.8*
Females															
9–13 y	1,300	21*	700	2*	120	8	240	1.6*	34	1,250	40	8	4.5*	1.5*	2.3*
14–18 y	1,300	24*	890	3*	150	15	360	1.6*	43	1,250	55	9	4.7*	1.5*	2.3*
19–30 y	1,000	25*	900	3*	150	18	310	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.5*	2.3*
31–50 y	1,000	25*	900	3*	150	18	320	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.5*	2.3*
51–70 y	1,200	20*	900	3*	150	8	320	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.3*	2.0*
> 70 y	1,200	20*	900	3*	150	8	320	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.2*	1.8*
Pregnancy															
14–18 y	1,300	29*	1,000	3*	220	27	400	2.0*	50	1,250	60	12	4.7*	1.5*	2.3*
19–30 y	1,000	30*	1,000	3*	220	27	350	2.0*	50	700	60	11	4.7*	1.5*	2.3*
31–50 y	1,000	30*	1,000	3*	220	27	360	2.0*	50	700	60	11	4.7*	1.5*	2.3*
Lactation															
14–18 y	1,300	44*	1,300	3*	290	10	360	2.6*	50	1,250	70	13	5.1*	1.5*	2.3*
19–30 y	1,000	45*	1,300	3*	290	9	310	2.6*	50	700	70	12	5.1*	1.5*	2.3*
31–50 y	1,000	45*	1,300	3*	290	9	320	2.6*	50	700	70	12	5.1*	1.5*	2.3*

NOTE: This table (taken from the DRI reports, see www.nap.edu) presents Recommended Dietary Allowances (RDAs) in bold type and Adequate Intakes (AIs) in ordinary type followed by an asterisk (*). An RDA is the average daily dietary intake level; sufficient to meet the nutrient requirements of nearly all (97–98 percent) healthy individuals in a group. It is calculated from an Estimated Average Requirement (EAR). If sufficient scientific evidence is not available to establish an EAR, and thus calculate an RDA, an AI is usually developed. For healthy breastfed infants, an AI is the mean intake. The AI for other life stage and gender groups is believed to cover the needs of all healthy individuals in the groups, but lack of data or uncertainty in the data prevent being able to specify with confidence the percentage of individuals covered by this intake.

SOURCES: *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride* (1997); *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline* (1998); *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids* (2000); and *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc* (2001); *Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate* (2005); and *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D* (2011). These reports may be accessed via www.nap.edu.

Anexo 8

Dietary Reference Intakes (DRIs): Tolerable Upper Intake Levels, Elements
Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies

Life Stage Group	Arsenic ^d	Boron	Calcium	Chromium	Copper	Fluoride	Iodine	Iron	Magnesium	Manganese	Molybdenum	Nickel	Phosphorus	Selenium	Silicon ^e	Vanadium	Zinc	Sodium	Chloride
Infants																			
0 to 6 mo	ND ^a	ND	1,000	ND	ND	0.7	ND	40	ND	ND	ND	ND	ND	45	ND	ND	4	ND	ND
6 to 12 mo	ND	ND	1,500	ND	ND	0.9	ND	40	ND	ND	ND	ND	ND	60	ND	ND	5	ND	ND
Children																			
1–3 y	ND	3	2,500	ND	1,000	1.3	200	40	65	2	300	0.2	3	90	ND	ND	7	1.5	2.3
4–8 y	ND	6	2,500	ND	3,000	2.2	300	40	110	3	600	0.3	3	150	ND	ND	12	1.9	2.9
Males																			
9–13 y	ND	11	3,000	ND	5,000	10	600	40	350	6	1,100	0.6	4	280	ND	ND	23	2.2	3.4
14–18 y	ND	17	3,000	ND	8,000	10	900	45	350	9	1,700	1.0	4	400	ND	ND	34	2.3	3.6
19–30 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40	2.3	3.6
31–50 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40	2.3	3.6
51–70 y	ND	20	2,000	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40	2.3	3.6
> 70 y	ND	20	2,000	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	3	400	ND	1.8	40	2.3	3.6
Females																			
9–13 y	ND	11	3,000	ND	5,000	10	600	40	350	6	1,100	0.6	4	280	ND	ND	23	2.2	3.4
14–18 y	ND	17	3,000	ND	8,000	10	900	45	350	9	1,700	1.0	4	400	ND	ND	34	2.3	3.6
19–30 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40	2.3	3.6
31–50 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40	2.3	3.6
51–70 y	ND	20	2,000	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40	2.3	3.6
> 70 y	ND	20	2,000	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	3	400	ND	1.8	40	2.3	3.6
Pregnancy																			
14–18 y	ND	17	3,000	ND	8,000	10	900	45	350	9	1,700	1.0	3.5	400	ND	ND	34	2.3	3.6
19–30 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	3.5	400	ND	ND	40	2.3	3.6
61–50 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	3.5	400	ND	ND	40	2.3	3.6
Lactation																			
14–18 y	ND	17	3,000	ND	8,000	10	900	45	350	9	1,700	1.0	4	400	ND	ND	34	2.3	3.6
19–30 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	ND	40	2.3	3.6
31–50 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	ND	40	2.3	3.6

NOTE: A Tolerable Upper Intake Level (UL) is the highest level of daily nutrient intake that is likely to pose no risk of adverse health effects to almost all individuals in the general population. Unless otherwise specified, the UL represents total intake from food, water, and supplements. Due to a lack of suitable data, ULs could not be established for vitamin K, thiamin, riboflavin, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and carotenoids. In the absence of a UL, extra caution may be warranted in consuming levels above recommended intakes. Members of the general population should be advised not to routinely exceed the UL. The UL is not meant to apply to individuals who are treated with the nutrient under medical supervision or to individuals with predisposing conditions that modify their sensitivity to the nutrient.

^aAlthough the UL was not determined for arsenic, there is no justification for adding arsenic to food or supplements.

^bThe ULs for magnesium represent intake from a pharmacological agent only and do not include intake from food and water.

^cAlthough silicon has not been shown to cause adverse effects in humans, there is no justification for adding silicon to supplements.

^dAlthough vanadium in food has not been shown to cause adverse effects in humans, there is no justification for adding vanadium to food and vanadium supplements should be used with caution. The UL is based on adverse effects in laboratory animals and this data could be used to set a UL for adults but not children and adolescents.

^eND = Not determinable due to lack of data of adverse effects in this age group and concern with regard to lack of ability to handle excess amounts. Source of intake should be from food only to prevent high levels of intake.

SOURCES: *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride (1997); Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline (1998); Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids (2000); Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc (2001); Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate (2005); and Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D (2011).* These reports may be accessed via www.nap.edu.

Anexo 9 - Mercúrio Total

Todos os reagentes utilizados possuíam um elevado grau de pureza e foi utilizada água ultra pura (obtida pelo sistema Milli-Q Plus Millipore), Óxido de alumínio 90 activo básico (0,063-0,200) (Merck), Ácido nítrico 65 % (m/m) (Merck), Solução de ácido nítrico 1 % (v/v), Solução padrão de mercúrio 1000 mg/l (Nitrato de mercúrio II em 0,5 M de ácido nítrico) (Merck). Preparou-se 100 ml de uma solução padrão de concentração 10 µg/ml a partir da solução padrão de mercúrio (1000 mg/l), utilizando como solvente o ácido nítrico a 1 %. A partir da solução a 10 µg/ml preparou-se uma solução padrão de 0,1 µg/ml e uma de 0,005 µg/ml.

Usou-se material de uso corrente de laboratório, Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204), Moinho granulador de laboratório (Retsch, GM 200), Barquinhas de níquel, Analisador de mercúrio (Leco, AMA 254).

A avaliação da precisão do equipamento foi efectuada pela análise periódica de materiais de referência DORM-2 (Proteína de peixe; Canadian National Research Council).

Pesou-se 100 mg da amostra na barquinha, adicionou-se um pouco de óxido de alumínio para cobrir a amostra de seguida colocou-se barquinha no analisador de mercúrio e efectuou-se a leitura de acordo com as instruções do aparelho.

Foi aceite a curva introduzida no software do analisador (0,10; 0,30; 1,00; 3,00; 10,00; 20,00; 30,00; 36,00 ng de mercúrio).

O tratamento dos resultados foi feito através do software do analisador de mercúrio.

O cálculo do teor de mercúrio, é expresso em mg/kg, foi dado pela relação:

$$\frac{A}{m}$$

Sendo:

m - massa, em miligrama, da toma para análise;

A - leitura dada pelo analisado em μg .

Os resultados são dados pela média aritmética de, pelo menos, duas determinações paralelas.

Tabela dos Limite de detecção (LD) e concentração dos elementos (expresso em mg/kg) analisados no presente trabalho por AAS (espectrofotometria de absorção atômica) em material de referência certificados (MRC) ($n \geq 4$).

Elemento	LD	MRC	Valor obtido (mg/kg)	Valor certificado (mg/kg)
Cádmio	0,04 $\mu\text{g/kg}$	DORM-2	0,04 \pm 0,003	0,043 \pm 0,008
		TORT-2	26,1 \pm 0,3	26,7 \pm 0,6
		CRM-422	0,016 \pm 0,002	0,017 \pm 0,002
Chumbo	0,6 $\mu\text{g/kg}$	DORM-2	0,066 \pm 0,004	0,065 \pm 0,007
		TORT-2	0,34 \pm 0,08	0,35 \pm 0,13
		CRM-422	0,091 \pm 0,005	0,085 \pm 0,015
Mercúrio total	0,5 $\mu\text{g/kg}$	DORM-2	4,68 \pm 0,17	4,64 \pm 0,26
		TORT-2	0,28 \pm 0,00	0,27 \pm 0,06
		CRM-463	2,99 \pm 0,02	2,85 \pm 0,16

Anexo 10- Espectrofotometria de absorção atômica de chama

Solução-Padrão para o cádmio

A Solução padrão para o cádmio preparou-se a partir de 100 ml de uma solução padrão de concentração 10 $\mu\text{g/ml}$ a partir de uma solução padrão de cádmio (1000 mg/l), utilizando como solvente ácido nítrico a 5 %. A partir desta preparou-se uma solução padrão intermédia de cádmio a 1 $\mu\text{g/ml}$ em ácido nítrico de 5 % e a partir desta uma de 10 $\mu\text{g/l}$. A solução padrão de trabalho de cádmio a 1 $\mu\text{g/l}$ em ácido nítrico 1 % foi preparada a partir da solução de 10 $\mu\text{g/l}$

Solução-Padrão para o chumbo

Preparou-se 100 ml de uma solução padrão de concentração 10 $\mu\text{g/ml}$ a partir da solução padrão de chumbo (1000 mg/l), utilizando como solvente ácido nítrico a 5 %. A partir desta preparou-se uma solução padrão intermédia de chumbo 100 $\mu\text{g/l}$ em ácido nítrico 5 %. A solução padrão de trabalho de chumbo a 20 $\mu\text{g/l}$ em ácido

nítrico 1 % foi preparada a partir da solução a 100 µg/l. O espectrofotômetro de absorção atômica de chama (Varian, Spectr AA 55B).

A chama utilizada foi de ar-acetileno, Computador (Dell Optip, GXE 70SD) com software de aquisição de dados, Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204), Moinho granulador de laboratório (Retsch, GM 200), Estufa regulável a 100 ± 5 °C (Cassel), Mufla regulável a 500 °C (Heraeus, tipo MR 170 E), Placa eléctrica (Schott-Geräte, CK 111), Cadinhos de quartzo, Filtros (Macherey-Nagel 640 w, Ø = 70 cm).

Anexo 11 - Glicogénio

Hidrolisou-se a amostra liofilizada 25 mg previamente pesada na Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204) com 15 ml de hidróxido de potássio a 33% (Merck) durante 15 minutos em banho maria a 100 °C. Retirou-se 500 µl para tubos de centrífuga de plástico e adicionou-se a solução saturada de sulfato de sódio anidro e 2 ml de etanol a 96%.

Agitou-se e colocou-se num banho de gelo durante 30 minutos para a formar um precipitado branco. De seguida centrifugou-se a 1400 rpm durante 10 minutos a 2 °C numa centrífuga (Sigma 3K30, Germany). Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 0,5 ml de água destilada e 1 mL de etanol a 96 % e colocou-se novamente num banho de gelo durante 30 minutos.

Deixou-se precipitar novamente durante 30 minutos e voltou-se a centrifugar, nas mesmas condições. Fez-se reagir o glicogénio precipitado em 0,5 ml de água destilada e 3 ml de reagente de antrona, em banho de água a 90 °C, durante 20 minutos.

Mediu-se a absorvância do complexo glicogénio-antrona a 620 nm num espectrofotómetro marca (HLYIOS Unicam, UK). Preparou-se uma curva de calibração usando glicogénio como padrão. O reagente de antrona foi preparado em 45 ml de água à qual se adicionou 114 ml de ácido sulfúrico (Fluka, 95–97 %), concentrado e 0,225 g de antrona.

Anexo 12 – Descrição do Método EDFRX

O EDFRX é constituído por um tubo de raio X (Philips, PW 2184/00) constituído por um ânodo de tungsténio alimentado por uma fonte de alta tensão (Philips, PW 1140/00/60; 100 kV, 80 mA) equipado com um alvo secundário intermutável de moliibdénio (Mo) (que permite obter uma radiação de excitação praticamente monocromática, correspondentes às riscas K_{α} (17,44 KeV) e K_{β} (19,60 KeV), do Mo). O tubo de raios X, o alvo secundário e a amostra estão numa geometria tri-axial (permite uma redução do ruído de fundo e aumenta o contraste analítico devido à polarização da radiação).

Ambas as radiações de excitação e a resultante da amostra são direccionadas através de colimadores de prata. A radiação característica emitida pelos elementos presentes na amostra é detectada por um detector de Si (Li) da Oxford, com uma área activa de 30 mm² e uma janela de berílio de 8 µm de espessura que se encontra a 27 mm da amostra. A resolução do detector é de 136 eV a 5,9 KeV e o sistema de aquisição consiste no analisador multicanal Nucleus PCA III, sendo o tratamento de sinal e correcções ao tempo morto ajustadas automaticamente por um processador comercial da Oxford. O espectro é obtido através do software Quantum MCA.

As amostras liofilizadas foram colocadas num cilindro e comprimidas numa prensa à pressão de 10 Torr, formando uma pastilha circular com cerca de 2 cm de diâmetro e 1 mm de espessura. A pastilha foi colocada na película de *mylar* do diapositivo.

O diapositivo contendo a amostra foi colocado num suporte e ligou-se o equipamento. A corrente é regulada para 20 mA e uma tensão de 50 Kv. Cada pastilha foi exposta à radiação durante 1000 segundos.

A partir dos espectros obtidos (energia *versus* intensidade) determina-se a energia correspondente a cada pico observado. Os elementos existentes na amostra são identificados comparando essas energias com as energias teóricas correspondentes aos diferentes elementos. Após calculada a intensidade de cada radiação, a concentração dos elementos detectados determina-se através da expressão:

$$I_i = I_0 K_i c_i m C_i$$

Sendo:

I_i - intensidade da radiação X característica do elemento i

I_0 - intensidade da radiação incidente

K_i - factor de calibração experimental

C_i - concentração do elemento i

m - massa superficial da amostra (g cm^{-2})

C_i - factor de atenuação

A quantificação é efectuada através do “software” “XRF - Quantitative Calculation (fundamental parameters)” para ambiente Windows.

O resultado do teor de cada elemento analisado, expresso em mg/kg de peso húmido, foi calculado tendo em conta o seu teor em mg/kg de peso seco (dado pelo “software”) e a humidade de cada amostra analisada.

O resultado é dado pela média aritmética de, pelo menos, duas determinações paralelas.